

HUGO MIGUEL TEIXEIRA FERRAZ DOS SANTOS SOUSA

PERSPECTIVA ACTUAL DO CARCINOMA GÁSTRICO:
DA NECESSIDADE DE DIAGNÓSTICO PRECOCE À IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES
COM BASE EM ALTERAÇÕES DA GLICOSILAÇÃO DE PROTEÍNAS

PORTO | 2010

Dissertação de Candidatura ao Grau de Mestre
apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade do Porto

Mestrado em Medicina e Oncologia Molecular

Artº 48, § 3º - A Faculdade não responde pelas doutrinas
expendidas na dissertação. (Regulamento da Faculdade de
Medicina do Porto – Decreto nº 19337, 29 de Janeiro de 1931

À Joana

Ao Francisco Maria

Ao João Maria

Aos meus pais

Ao meu irmão

À minha família

Aos meus amigos

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Pinto de Sousa, meu orientador, pela ajuda em encontrar e permanecer no *rumo* certo, pela disponibilidade inigualável, pelo rigor científico e metodológico e pelo incentivo constante com que me guiou ao longo deste caminho

Ao Professor Doutor Cardoso de Oliveira, pelo voto de confiança em mim ao propor-me a realização deste Mestrado

Ao Professor Doutor Amadeu Pimenta, pelo exemplo de pessoa e cirurgião que foi e por me ter incentivado a concretizar este trabalho e a investigar nesta área

À Professora Doutora Leonor David e sua equipa de investigação, pela preciosa colaboração na concepção deste projecto e na análise do estudo molecular

Ao Professor Doutor Celso Reis, pelo apoio científico na análise dos resultados do estudo molecular

À Professora Doutora Fátima Carneiro, pela presença constante que me tem acompanhado desde o início da minha formação profissional, com a sua simpatia, disponibilidade e incentivo

À Dr.^a Catarina Gomes, pela parceria e ajuda fundamental na obtenção e na análise dos resultados dos estudos moleculares

À Dr.^a Helena Coutinho e aos elementos do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital São João EPE, pela simpatia e pelo tempo que graciosamente despenderam na obtenção do material para os estudos moleculares

Ao Dr. José Costa Maia, pelos desafios constantes e pelo voto de confiança em mim e nos projectos em que estou envolvido no Serviço de Cirurgia Geral do Hospital São João EPE

Ao Mestre Eduardo Lima da Costa, pelo companheirismo, cumplicidade, disponibilidade na partilha científica e, acima de tudo, pela boa disposição nos momentos mais cansativos

Ao Mestre John Preto, pelo apoio, incentivo, disponibilidade incansável, pelo seu exemplo como pessoa e profissional e por apostar em mim e na minha formação

Aos colegas do Serviço de Cirurgia Geral do Hospital São João EPE, pela amizade, companheirismo, boa disposição, que foram um importante incentivo nas horas mais árduas deste projecto

A todos os elementos do Bloco Central do Hospital São João EPE pela sua disponibilidade, sem os quais não teria sido possível recolher as amostras para este e outros estudos futuros

RESUMO

No contexto da enorme importância epidemiológica, clínica, patológica e social do carcinoma do estômago em Portugal, dada a dificuldade em encontrar dados credíveis na literatura que documentem a realidade portuguesa, a análise crítica dos resultados conseguidos, ao longo das duas últimas décadas, num hospital central afigura-se-nos um passo fundamental para o avanço na melhoria dos cuidados assistenciais dos doentes com carcinoma do estômago.

Dado o diagnóstico tardio da doença na maioria dos casos, existe uma necessidade premente de desenvolver novas formas de diagnóstico precoce e de rastreio eficaz das populações. A maioria dos biomarcadores é baseada na expressão de novos antígenos pelas células tumorais e a sua detecção no soro depende da produção pelas mesmas e libertação para a corrente sanguínea. Assim, as células neoplásicas apresentam frequentemente alterações na glicosilação, que resultam na expressão de O-glicanos truncados ligados a proteínas, incluindo as mucinas, e de formas sialiladas dos antígenos do tipo Lewis.

Caracterização clínico-patológica e prognóstica do carcinoma gástrico: A evolução da nossa realidade

Esta etapa do estudo procurou contribuir para o conhecimento da realidade actual do carcinoma gástrico em Portugal e a sua evolução ao longo dos últimos anos.

Os objectivos desta etapa do estudo foram os seguintes: *caracterização clínico-patológico e molecular do carcinoma gástrico nas duas últimas décadas e a sua evolução ao longo do tempo; análise da sobrevida de acordo com os parâmetros clínico-patológicos e moleculares nos diferentes períodos do estudo; identificação de factores de prognóstico; caracterização clínico-patológica de alguns grupos de doentes (Early Gastric Cancer; Early Onset Gastric Cancer; tipo difuso e intestinal de Laurén; tumores da JEG, do fundo/corpo e do antro).*

O trabalho baseou-se num estudo retrospectivo de 1272 doentes com carcinoma do estômago ou da JEG que foram tratados entre Janeiro de 1988 e Dezembro de 2008, numa única instituição, o Hospital São João EPE (Serviços de Cirurgia 4, Cirurgia B e Cirurgia Geral). Foram estudados os seguintes parâmetros clínicos, patológicos, moleculares e de estadiamento: *idade, sexo, localização tumoral, ressecabilidade, tipo de cirurgia de ressecção, tipo de ressecção, linfadenectomia (Siewert e Japonesa), número de gânglios estudados, dimensões do tumor, forma macroscópica, classificação histológica (da OMS, de Laurén, de Carneiro e colaboradores, de Ming), invasão venosa, permeação linfática, invasão perineural, citologia peritoneal, tipo de carcinoma (EGC vs avançado), progressão do tumor na parede (T), metastização ganglionar (N) – classificação TNM e Japonesa, rácio ganglionar, metastização à distância (M), estadio, p53, HER2/neu (c-erb B2), MUC1, MUC1 infraglicosilado e MUC5AC.*

No sentido de avaliar a evolução ao longo do tempo do perfil clínico-patológico e molecular dos carcinomas gástricos, procedeu-se à divisão da série global em três períodos de 7 anos. Na análise estatística dos resultados foi utilizado o programa de computador SPSS 16.0. As médias foram comparadas pelo teste t de *Student*, a variância pelo método Anova e as proporções pelo teste do qui-quadrado ou pelo teste exacto de Fisher. As curvas de sobrevida cumulativa

foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e as diferenças pesquisadas pelo teste de log rank. A identificação dos factores de prognóstico foi pesquisada pelo modelo de Cox. Foram considerados significativos os valores de p inferiores a 0,05.

A nossa realidade é compatível com a dos países com elevada incidência de cancro gástrico, pois registou-se um predomínio dos carcinomas distais (51,1%), sem se ter observado a migração proximal do cancro do estômago típica dos países do Ocidente. Por outro lado, verificou-se uma elevada frequência de tumores do tipo intestinal (49,22%) que se associa aos factores ambientais das regiões com incidência mais alta.

Os carcinomas proximais e os distais são entidades diferentes de carcinoma gástrico, uma vez que apresentaram diferenças nos seguintes parâmetros clínico-patológicos: *sexo, dimensões tumorais, forma macroscópica, classificação de Laurén, invasão venosa, permeação linfática, invasão perineural, progressão do tumor na parede, metastização ganglionar e estadio*. Os carcinomas proximais associaram-se a sobrevidas inferiores (39% aos 5 anos) em relação aos tumores distais (46% aos 5 anos).

Os tumores do tipo intestinal e do tipo difuso, segundo a classificação de Laurén, apresentaram diferenças significativas nas seguintes características clínico-patológicas: *idade, localização tumoral, forma macroscópica, classificação de Ming, invasão venosa e perineural, progressão do tumor na parede, metastização ganglionar e estadio*. A agressividade biológica dos tumores do tipo difuso associada a menor número de ressecções do tipo R0, foi responsável por curvas de sobrevida inferiores (37% aos 5 anos) em comparação com as do tipo intestinal (46% aos 5 anos).

A incidência de EOGC foi 10,59% e confirma-se que se trata de uma entidade clínica distinta, pois apresentou diferenças em relação aos restantes doentes em vários parâmetros: *dimensões tumorais, forma macroscópica, classificações histológicas (da OMS, de Laurén, de Carneiro e colaboradores, de Ming), invasão venosa e permeação linfática*. A sobrevida dos doentes com EOGC foi significativamente superior (44% aos 5 anos) em comparação com os doentes idosos, devido à maior agressividade e radicalidade cirúrgicas observadas neste grupo.

A incidência de EGC foi relativamente baixa (12,68%) e estável. Este tipo de tumores apresentou características associadas a melhor prognóstico em todos os seguintes parâmetros: *dimensões tumorais, forma macroscópica, classificação histológica (de OMS, de Laurén, de Carneiro e colaboradores, de Ming), invasão venosa, permeação linfática e invasão perineural*. É de realçar que a baixa incidência de metastização ganglionar (apenas 23,87%), aliada à ressecção completa dos tumores em todos os casos, foi responsável pela elevada taxa de sobrevida destes doentes (73% aos 5 anos).

No que diz respeito ao tratamento, registou-se uma tendência para a diminuição da taxa de inoperabilidade (14,8%), embora a da cirurgia de não ressecção tenha permanecido estável (19,1%). A ressecabilidade dos tumores só foi possível em dois terços dos doentes (66,12%), o que é inferior à dos centros europeus de referência (82,7% GGCS). Observou-se uma opção crescente pela gastrectomia total (51,79%) que levou a aumento concomitante das ressecções do tipo R0 (79,86%). Associadamente, registou-se um aumento das linfadenectomias mais alargadas (D2, 53,87%) embora ainda se mantenha longe dos valores dos centros orientais.

Esta melhoria, ainda que ligeira, teve influência na sobrevida dos doentes (46% aos 5 anos nas linfadenectomias D2 e 57% aos 5 anos nas ressecções R0).

Relativamente ao estadiamento não se observaram diferenças ao longo do tempo. Registou-se assim uma tendência para o diagnóstico tardio que se associou a estadios avançados (III-IV) em 54,87% dos tumores. Assim, no momento do diagnóstico, 38,18% dos tumores apresentavam invasão da serosa e 72,76% eram T3-4; a mesma tendência verificou-se na metastização ganglionar com a sua presença em 66,58% dos doentes e, inclusivamente nos tumores N0, observou-se a presença de permeação linfática em 46,2% dos doentes.

A sobrevida cumulativa dos doentes foi 33,7% aos 5 anos e não variou significativamente ao longo do tempo (43% aos 5 anos). Mesmo nos tumores ressecados, a sobrevida aos 5 anos foi 41%, mas apesar de ter aumentado ao longo do tempo (54% aos 5 anos) mantém-se distante dos valores de alguns centros japoneses de referência.

Na análise da sobrevida de acordo com as diferentes características clínico-patológicas observaram-se diferenças significativas nos seguintes parâmetros: *dimensões tumorais, forma macroscópica, classificação de Ming, invasão venosa, permeação linfática, invasão perineural, p53, HER2/neu e citologia*. A idade, a progressão do tumor na parede e o rácio ganglionar foram identificados como factores de prognósticos independentes.

Face ao exposto, concluiu-se que o prognóstico dos doentes com carcinoma gástrico continua sombrio devido fundamentalmente ao diagnóstico tardio e o panorama actual não parecer estar a melhorar de forma significativa. Uma vez que o tratamento cirúrgico não parece passível de uma margem de progressão adicional significativa, emerge a necessidade do diagnóstico precoce se se pretender melhorar a sobrevida destes doentes. Aparentemente, entre nós, não parecem reunidas as condições necessárias para a implementação de formas de rastreio invasivas, pelo que será necessário apostar em formas menos invasivas de diagnóstico, nomeadamente através de novos biomarcadores serológicos.

Alterações da O-glicosilação das proteínas: Biomarcadores para diagnóstico precoce de carcinoma gástrico

Nesta segunda parte da nossa investigação, foram estudadas as alterações da O-glicosilação das proteínas na procura de biomarcadores que permitam o diagnóstico precoce do carcinoma gástrico.

Os objectivos desta etapa do estudo foram os seguintes: *caracterização do padrão imunohistoquímico dos antígenos de carboidratos simples das mucinas e dos antígenos de carboidratos do tipo Lewis nos carcinomas gástricos ressecados; caracterização clínico-patológica de acordo com os diferentes padrões de expressão dos antígenos estudados*.

De um universo de 50 doentes com carcinoma do estômago ou da JEG submetidos a cirurgia entre Janeiro de 2009 e Outubro de 2009, no Serviço de Cirurgia Geral do Hospital São João EPE, foram seleccionados 36 dos 38 carcinomas ressecados neste período para o estudo imunohistoquímico no tecido tumoral dos antígenos de carboidratos simples das mucinas

(*Tn*, *sialil-Tn*, *T* e *sialil-T*) e dos antígenos de carboidratos do tipo Lewis (*sialil-Lewis A* e *sialil-Lewis X*), que foi realizado no Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto (IPATIMUP), com os seguintes anticorpos monoclonais: *1E3*, *TKH2*, *B72.3*, *3C9*, *3C9/Neu*, *CA19.9* e *KM93*.

Foram estudados os seguintes parâmetros clínico-patológicos de acordo com o padrão de expressão dos antígenos: *idade*, *sexo*, *localização tumoral*, *dimensões do tumor*, *forma macroscópica*, *classificação histológica (da OMS, de Laurén, de Carneiro e colaboradores, de Ming)*, *invasão venosa*, *permeação linfática*, *invasão perineural*, *tipo de carcinoma (EGC vs avançado)*, *progressão do tumor na parede (T)*, *invasão da serosa*, *metastização ganglionar (N)* – *classificação TNM e rácio ganglionar e estadio*.

Na análise estatística dos resultados foi utilizado o programa de computador SPSS 16.0. As médias foram comparadas pelos testes não-paramétricos de Mann-Whitney e de Kruskal-Wallis, a variância pelo método Anova e as proporções pelo teste do qui-quadrado ou pelo teste exacto de Fisher. Foram considerados significativos os valores de *p* inferiores a 0,05.

Os carcinomas gástricos ressecados apresentaram uma elevada incidência da expressão nos tecidos dos antígenos de carboidratos simples das mucinas e dos antígenos de carboidratos do tipo Lewis, com uma imunorreactividade citoplasmática difusa ou membranal apical em mais de 25% das células em áreas bem definidas, na maioria dos casos.

Todos os casos de carcinoma gástrico estudados apresentaram a expressão de pelos menos 2 dos antígenos e dois terços a expressão de 4 a 5. A correlação entre os antígenos simples das mucinas foi elevada, o mesmo acontecendo para os antígenos do tipo Lewis.

Na análise do perfil clínico-patológico dos carcinomas gástricos de acordo com a expressão destes antígenos observaram-se as seguintes associações: ***Tn*** com a invasão venosa e a invasão perineural; ***STn (TKH2)*** com a localização tumoral e ***STn (B72.3)*** com a localização tumoral e a forma macroscópica; ***T*** com a idade, o sexo, as dimensões e a localização tumorais; ***ST*** com a forma macroscópica e a classificação da OMS; ***SLe^a*** e ***SLe^x*** com as dimensões do tumor.

Relativamente ao estadiamento dos tumores também se verificaram associações com a expressão destes antígenos: ***Tn*** com a progressão do tumor na parede (invasão da serosa), a metastização ganglionar e o estadio; ***STn (TKH2)*** com metastização ganglionar (rácio ganglionar); ***SLe^a*** com a progressão do tumor na parede (invasão da serosa) e a metastização ganglionar; ***SLe^x*** com a progressão do tumor na parede, a metastização ganglionar e o estadio. Os antígenos T e ST não mostraram diferenças no padrão de expressão de acordo com o estadiamento.

Assim, concluiu-se que as alterações da O-glicosilação das proteínas estão relacionadas com o carcinoma gástrico, quer pela sua elevada incidência quer pela sua associação a diversas características clínico-patológicas.

O conhecimento obtido através este estudo poderá funcionar como ponto de partida para futuras investigações, tendo em vista a identificação de novos biomarcadores com base em alterações da glicosilação de proteínas.

SUMMARY

Stomach carcinoma in Portugal has an enormous epidemiological, clinical, pathological and social importance. Given the difficulty of finding in the medical literature, evidence that reports the Portuguese reality, the critical analysis of the results obtained in the past two decades, from a University Hospital, represents to us a fundamental step in achieving better care for patients with stomach carcinoma.

Given the delayed diagnosis in the majority of the cases, there is a need to develop new forms of early detection and efficient screening of the population. The majority of the biomarkers are based on the expression of new antigens by the tumor cells. The serum measurement depends on their production by the tumor cells and liberation into the blood stream. The tumor cells usually present glycosylation alterations that results in the expression of truncated O-glycans binded to proteins, including mucins, and sialylated forms of Lewis type antigens.

Clinico-pathological and prognostic characterization of Gastric Carcinoma: The Evolution of our Reality

This phase of the study tried to contribute to the understanding of the present reality of gastric carcinoma in Portugal and its evolution in the past years.

The aims of this phase of the study were the following: clinico-pathological and molecular characterization of gastric carcinoma in the last two decades and its evolution; analysis of survival according to the clinico-pathological and molecular parameters during the different phases of the study; identification of prognostic factors; clinico-pathological characterization of some groups of patients (Early Gastric Cancer (EGC); Early Onset Gastric Cancer (EOGC); intestinal and diffuse type according to Lauren; tumours of the esophago-gastric junction (EGJ), fundus/body and antrum).

This retrospective study included 1272 patients with stomach or EGJ carcinoma that were treated between January 1988 and December 2008 in one single institution – São João Hospital EPE (Cirurgia 4, Cirurgia B and Cirurgia Geral). The following clinical, pathological, molecular and staging parameters were studied: age, gender, tumor location, resectability, type of resection surgery, type of resection, lymphadenectomy (Siewert and Japanese), number of lymph nodes studied, dimensions of the tumor, macroscopic form, histological classification (WHO, Lauren, Carneiro et al, Ming), venous invasion, lymphatic permeation, perineural invasion, peritoneal cytology, type of carcinoma (EGC vs advanced), depth wall invasion (T), lymph node metastases (N) – TNM and Japanese classification, lymph node ratio, distance metastases (M), stage, p53, HER2/neu (c-erb B2), MUC1, MUC1 infraglicosilated, MUC5AC.

The global series was divided into three periods of seven years in order to evaluate the evolution of the clinico-pathological and molecular profile of gastric carcinomas over the time.

The software SPSS 16.0 was used to perform the statistical analysis of the results. Student's t-test was used to compare averages, and proportions were done by the Chi-squared test or

Fisher's exact test. The cumulative survival curves were calculated by the Kaplan-Meier method and the differences were sought out by log rank test. The Cox model was used to identify prognostic factors. Values of p inferior to 0,05 were considered statistically significant.

Our reality is compatible with that of other countries with a high incidence of gastric cancer, characterized by a predominance of distal carcinomas (51,1%), and without the observed proximal migration that is typical of Western countries. On the other hand, a high incidence of intestinal type tumours (49,22%) were observed, which is associated with environmental factors of regions with a higher incidence.

Proximal and distal carcinomas are different entities of gastric cancer, presenting differences in their clinico-pathological profiles in the following parameters: gender, tumor dimensions, macroscopic form, Lauren classification, venous invasion, lymphatic permeation, perineural invasion, depth wall invasion, lymph node metastases and stage. Proximal carcinomas were associated with inferior survivals (39% at 5 years) in relation to distal tumors (46% at 5 years).

Intestinal and diffuse type carcinomas according to Lauren's classification, presented significant differences in the following clinico-pathological characteristics: age, tumor location, macroscopic form, Ming classification, venous and perineural invasion, depth wall invasion, lymph node metastases and stage. The biological aggressiveness of these diffuse type tumors was associated with a lesser number of resections type R0, inferior survival curves (37% at 5 years) in comparison with intestinal type (46% at 5 years).

EOGC, with an incidence of 10,59%, revealed to be a clinical distinct entity that presented differences in various parameters when compared to other patients: tumor dimensions, macroscopic form, histological classifications (WHO, Lauren, Carneiro et al., Ming), venous invasion and lymphatic permeation. The survival of patients with EOGC was significantly superior (44% at 5 years) to elderly patients, due to their higher aggressivity.

The incidence of EGC was relatively low (12,68%) and stable. This type of tumor presented characteristics associated with a better prognosis in the following parameters: tumor dimensions, macroscopic form, histological classifications (WHO, Lauren, Carneiro et al., Ming), venous invasion, lymphatic permeation and perineural invasion. Lymph node metastases were present in only 23,8% of the cases, which associated with a complete resectability of the tumors, in all cases, were responsible for the high survival rate of these patients (73% at 5 years).

Regarding treatment, there was a trend towards a decrease of the nonoperating rate (14,8%), although the non resection surgery rate remained stable (19,1%). Resection of the tumors was only possible in two thirds of the patients (61,12%), which is inferior to the european centers of reference (82,7% GGCS). An increasing option for total gastrectomy (51,79%) was observed, leading to a subsequent increase in resections type R0 (79,86%). An increase in more extensive lymphadenectomies was noted (53,87% of lymphadenectomies D2), even though this value continues to be far from oriental centers. This improvement, although slight, influenced survival of the patients (46% at 5-years for lymphadenectomies D2 and 57% at 5-years for R0 resections).

No differences in staging were observed over time. A tendency for late diagnosis was observed and associated with advanced stages (III-IV) in more than half of the tumors (54,87%). So, at the time of diagnosis, more than one third of the tumors (38,18%) presented serosal invasion and more than two thirds (72,76%) were T3-4; lymph node metastases were present in two thirds of the patients (66,58%) and inclusively in N0 tumors, the presence of lymphatic permeation was observed in more than half of the patients (46,2%).

The cumulative survival of the patients continues to be low (33,7% at 5-years) and has not significantly varied over time (43% at 5-year). Even in resected tumors the survival rate at 5 years was 41% and even though it increased over time (54% at 5 years), it continues to be distant from the values of some of the referral centers of Japan.

The survival analysis according to the different clinico-pathological characteristics revealed significant differences in the following parameters: tumor dimensions, macroscopic form, Ming classification, venous invasion, lymphatic permeation, perineural invasion, p53, HER2/neu and cytology. The age, depth wall invasion and lymph node metastases according to the lymphatic ratio were identified as independent prognostic factors.

Based on these findings, the authors conclude that the prognosis of the patients with gastric carcinoma continues to be gloomy mainly due to the late diagnosis and the fact that the present panorama does not seem to be significantly improving. Given that the surgical treatment doesn't seem plausible of achieving a margin of significant additional progression, the need for an early diagnosis emerges if an improvement in patient survival is desired. Apparently, among us, it doesn't seem possible to gather the necessary conditions for the implementation of more invasive screening tests, so there will be a need to bet on less invasive forms of diagnosis, namely through new serological biomarkers.

***O*-glycosylation alterations of proteins: Biomarkers for the early diagnosis of gastric carcinoma**

In this second part of our investigation, of *O*-glycosylation alterations of proteins were studied (mucins and Lewis type) in the search for biomarkers that may allow early diagnosis of gastric carcinoma.

The aims of this phase of the study were the following: characterization of the immunohistochemical pattern of the simple mucin-type carbohydrate antigens and the Lewis carbohydrate antigens of resected gastric carcinomas; clinico-pathological characterization according to the different patterns of expression of the antigens studies.

From a universe of 50 patients with stomach or EGJ carcinoma submitted to surgical treatment between January 2009 and October 2009, at General Surgery Department of São João Hospital, EPE, 36 out of 38 carcinomas resected during this period, were selected for a tumor tissue immunohistochemical study of the simple mucin-type carbohydrate antigens (*Tn*, *sialil-Tn*, *T* and *sialil-T*) and the Lewis carbohydrate antigens (*sialil-Lewis A* and *sialil-Lewis X*), that was performed at the Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto

(IPATIMUP), with the following monoclonal antibodies: *1E3*, *TKH2*, *B72.3*, *3C9*, *3C9/Neu*, *CA19.9* and *KM93*.

The following clinico-pathological parameters, according to the expression pattern of the antigens, were studied: age, gender, tumor location, tumor dimensions, macroscopic form, histological classification (WHO, Lauren, Carneiro et al, Ming), venous invasion, lymphatic permeation, perineural invasion, type of carcinoma (EGC vs advanced), depth wall invasion (T), serosal invasion, lymph node metastases (N) – TNM classification, lymph node ratio and stage.

The software SPSS 16.0 was used for the statistical analysis of the results. The averages were compared by the non parametric tests of Mann-Whitney and Kruskal-Wallis; the variance by the Anova method and the proportions by the CHI-squared test or Fisher's exact test. Values inferior to 0,05 were considered statistically significant.

The resected gastric carcinomas presented a high incidence of tissue expression of the simple mucin-type carbohydrate antigens and the Lewis carbohydrate antigens, with a diffuse cytoplasmatic or apical membranar immunoreactivity in more than 25% of the cells in well defined areas, in the majority of the cases.

All of the cases of gastric carcinoma studied presented expression of at least 2 of the antigens and two thirds of the expression of 4 or 5. The correlation between the the simple mucin-type carbohydrate antigens was high, just as the same as with the Lewis carbohydrate antigens.

The analysis of the clinico-pathological profile of gastric carcinomas according to the expression of these antigens revealed the following associations: **Tn** with venous invasion and perineural invasion; **STn (TKH2)** with tumor location and **STn (B72.3)** with tumor location and macroscopic form; **T** with age, gender, tumor dimensions and location; **ST** with macroscopic form and WHO classification; **SLe^a** and **SLe^x** with the dimensions of the tumor.

Staging of the tumors also revealed associations with the expressions of these antigens: **Tn** with depth wall invasion (serosal invasion), lymph node metastases and stage; **STn (TKH2)** with lymph node metastases (lymphatic ratio); **SLe^a** with depth wall invasion (serosal invasion) and lymph node metastases; **SLe^x** with depth wall invasion, lymph node metastases and stage. The antigens T e ST did not reveal differences in the expression pattern according to staging.

In conclusion, *O*-glycosylation alterations of proteins are related with gastric carcinoma, due to its high incidence, and due to its association with various clinico-pathological characteristics. The knowledge obtained from this study might serve as a starting point for future investigations, taking into account the identification of new biomarkers based on glycosylation alterations of proteins.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	23
A importância do cancro gástrico a nível mundial	25
<i>Diferentes entidades clínico-patológicos de cancro gástrico</i>	27
A importância do cancro gástrico a nível regional	29
<i>Sobrevida</i>	29
Caracterização clínico-patológica e prognóstica do carcinoma gástrico	30
<i>Etiologia e factores de risco</i>	30
<i>Diagnóstico</i>	33
<i>Early Gastric Cancer</i>	34
<i>Tratamento</i>	35
<i>Factores de prognóstico</i>	36
<i>Padrões de recidiva</i>	39
Prevenção e diagnóstico precoce	40
Alterações da O-glicosilação de proteínas	41
<i>A expressão de mucinas no cancro gástrico</i>	41
<i>Alterações na glicosilação das proteínas no cancro gástrico</i>	42
OBJECTIVOS	49
Caracterização clínico-patológica e prognóstica do carcinoma gástrico:	
A evolução da nossa realidade	51
Alterações da O-glicosilação das proteínas:	
Biomarcadores para diagnóstico precoce de carcinoma gástrico	52
MATERIAL E MÉTODOS	53
Caracterização clínico-patológica e prognóstica do carcinoma gástrico:	
A evolução da nossa realidade	55
Alterações da O-glicosilação das proteínas:	
Biomarcadores para diagnóstico precoce de carcinoma gástrico	60
RESULTADOS	63
Caracterização clínico-patológica e prognóstica do carcinoma gástrico:	
A evolução da nossa realidade	65
<i>Caracterização clínica</i>	65
<i>Caracterização patológica e molecular</i>	67
<i>Estadiamento</i>	69

<i>Análise da sobrevida</i>	71
Análise por períodos	85
<i>Caracterização clínica</i>	85
<i>Caracterização patológica</i>	88
<i>Estadiamento</i>	92
<i>Análise da sobrevida</i>	94
Análise dos <i>Early Gastric Cancer</i>	96
<i>Caracterização clínica</i>	96
<i>Caracterização patológica</i>	98
Análise dos <i>Early Onset Gastric Cancer</i>	100
<i>Caracterização clínica</i>	100
<i>Caracterização patológica</i>	101
Análise segundo a classificação de Laurén	103
<i>Caracterização clínica</i>	103
<i>Caracterização patológica</i>	104
<i>Estadiamento</i>	105
Análise por localização	107
<i>Caracterização clínica</i>	107
<i>Caracterização patológica</i>	108
<i>Estadiamento</i>	109
Alterações da O-glicosilação das proteínas:	
Biomarcadores para diagnóstico precoce de carcinoma gástrico	111
<i>Caracterização clínico-patológica</i>	115
<i>Estadiamento</i>	119
DISCUSSÃO	123
Caracterização clínico-patológica e prognóstica do carcinoma gástrico:	
A evolução da nossa realidade	125
Alterações da O-glicosilação das proteínas:	
Biomarcadores para diagnóstico precoce de carcinoma gástrico	134
CONCLUSÕES	141
CONSIDERAÇÕES FINAIS	147
BIBLIOGRAFIA	151

ÍNDICE DE SIGLAS E ABREVIATURAS

GGCS – *German Gastric Cancer Study*

IGTSG – *Italian Gastrointestinal Tumor Study Group*

IPATIMUP – Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto

JGCA – *Japanese Gastric Cancer Association*

OMS – Organização Mundial de Saúde

UICC/AJCC – *Union Internationale Contre le Cancer/ American Joint Committee on Cancer*

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

BSA – Albumina do soro bovino

C1Gal-T1 – *core 1 β 1-3-galactosiltransferase*

C2GnT – *core 2 β 1-6 N-acetilglucosaminiltransferase*

CagA – *Citotoxin associated gene A*

CEA – *Carcinoembryonic Antigen*

DES – Dissecção Endoscópica da Submucosa

GalNAc – *N-acetilgalactosamina*

GlcNAc – *N-acetilglucosamina*

EGC – *Early Gastric Cancer*

ELAM – *Endothelial Adhesion Molecule 1, Seletina E*

EOGC – *Early Onset Gastric Cancer*

FISH – Hibridização *In Situ* por Imunofluorescência

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogénio

H. Pylori – *Helicobacter Pylori*

HE – Hematoxilina-Eosina

HR – *Hazard Ratio*

IHQ – Imunohistoquímica

JEG – Junção Esofógica-Gástrica

PAI-1 – *PA inhibitor*

PBS – *Phosphate Buffer Solution*

PCNA – *Proliferating Cell Nuclear Antigen*

pGalNac-Ts – UDP GalNac-polipeptídeo *N*-acetilgalactosaminil-transferase

QT – Quimioterapia

REM – Ressecção Endoscópica da Mucosa

RT – Radioterapia

SLe^a – Sialil Lewis A

SLe^x – Sialil Lewis X

ST – Sialil T

STn – Sialil Tn

ST6GalNac-T – GalNac α 2,6-sialiltransferase

T – Antígeno Thomsen-Friedenreich

UPA – *Urokinase-type plasminogen activator*

β 3/4 Gal-Ts – β 1-3/4-Galactosiltransferase

β 3/4 Gn-Ts – β 1-3/4-*N*-acetilglucosaminiltransferase

INTRODUÇÃO

O cancro é cada vez mais um problema *major* de saúde pública. Segundo as estatísticas mais recentes, a nível global (GLOBOCAN 2002), existem anualmente 10,9 milhões de novos casos de cancro e 6,7 milhões de mortes por cancro, com uma prevalência aos 3 anos de 24,6 milhões de pessoas [1]. Em 2009, nos Estados Unidos da América (EUA) foram diagnosticados 1.479.350 novos casos de cancro, dos quais 562.340 morreram. Neste país, o cancro foi responsável por mais mortes nas pessoas com menos de 85 anos do que as doenças cardiovasculares. A probabilidade de desenvolver, ao longo da vida, um cancro invasivo é superior nos homens (44%) do que nas mulheres (37%) [2].

O cancro do estômago ainda é um alvo privilegiado de investigação epidemiológica, clínica, patobiológica e molecular, sendo um dos cancros mais comuns e uma das causas mais frequentes de morte por cancro. No mundo, a incidência da doença, os exames diagnósticos e as opções terapêuticas sofreram uma importante evolução nas últimas décadas; no entanto, o prognóstico destes doentes continua a ser sombrio, principalmente nos estadios mais avançados [1, 3-7].

A importância do cancro gástrico a nível mundial

Até recentemente, o cancro gástrico era o segundo cancro mais frequente a nível mundial mas, actualmente, (estima-se 1,1 milhões de casos no ano 2010) com uma incidência de 934.000 casos/ano (8,6% dos casos de cancro em 2002), ocupa o quarto lugar, atrás do cancro do pulmão (1,35 milhões), da mama (1,15 milhões) e colo-rectal (1,02 milhões). No sexo masculino, ocupa o terceiro lugar (603.000), precedido do cancro do pulmão (965.000) e da próstata (679.000). No sexo feminino, ocupa o quinto lugar (330.000), precedido do cancro da mama (1,15 milhões), do colo do útero (493.000), colo-rectal (472.000) e do pulmão (386.000) [1].

As principais causas de mortes por cancro são o cancro do pulmão (1,18 milhões de mortes) seguido do cancro gástrico (700.000 mortes, o que corresponde a cerca de 12% de todas as mortes por cancro) [1]. Actualmente, as mortes por cancro gástrico atingem o 15º lugar em termos de mortalidade relativa a todas as causas, estimando-se, contudo, que em 2030 passem a ocupar a décima posição [8]. No sexo masculino, o cancro do estômago é a segunda causa de morte por cancro (446.000), à frente do da próstata (220.000) e atrás do do pulmão (848.000); no sexo feminino, este tipo de cancro (254.000) ultrapassa, em número de mortes por ano, o colo-rectal (250.000), ficando, porém, atrás dos cancros da mama (410.000), do pulmão (330.000) e do colo do útero (273.000) [1].

Cerca de dois terços dos casos de cancro gástrico ocorrem nos países em desenvolvimento, contribuindo a China, por si só, com 42% dos casos [1]. As taxas de incidência do cancro gástrico podem variar até 10 vezes entre as diferentes regiões do mundo (Figura 1), apresentando Yamagata, no Japão (com 95,5/100.000 nos homens), e Kanwha, na Coreia (com 65,9/100.000 nos homens) apresentam as taxas mais elevadas [9-10]. No Japão, o cancro gástrico continua a ser o mais frequente, quer no sexo masculino, quer no feminino, com taxas de incidência ajustadas à idade de 62,8/100.000 nos homens e 28,6/100.000 nas mulheres [11]. Assim, a Ásia Oriental, a Europa de Leste (particularmente os países que constituíram a



antiga União Soviética) e a América Central e do Sul aparecem como áreas de elevada incidência [5, 12-13]. Por outro lado, o Sul da Ásia, o Norte de África, a África Oriental, a América do Norte, a Austrália e a Nova Zelândia são regiões com baixa incidência [5]. Apesar de ser conhecida desde longa data a associação do carcinoma do estômago a áreas sócio-económicas desfavorecidas, o padrão de distribuição da doença em função deste parâmetro não é linear. Com efeito, nalguns países subdesenvolvidos ou em vias de desenvolvimento (Índia, Paquistão e Irão) registam-se taxas baixas, deixando antever uma causalidade multifactorial na génese do carcinoma do estômago.

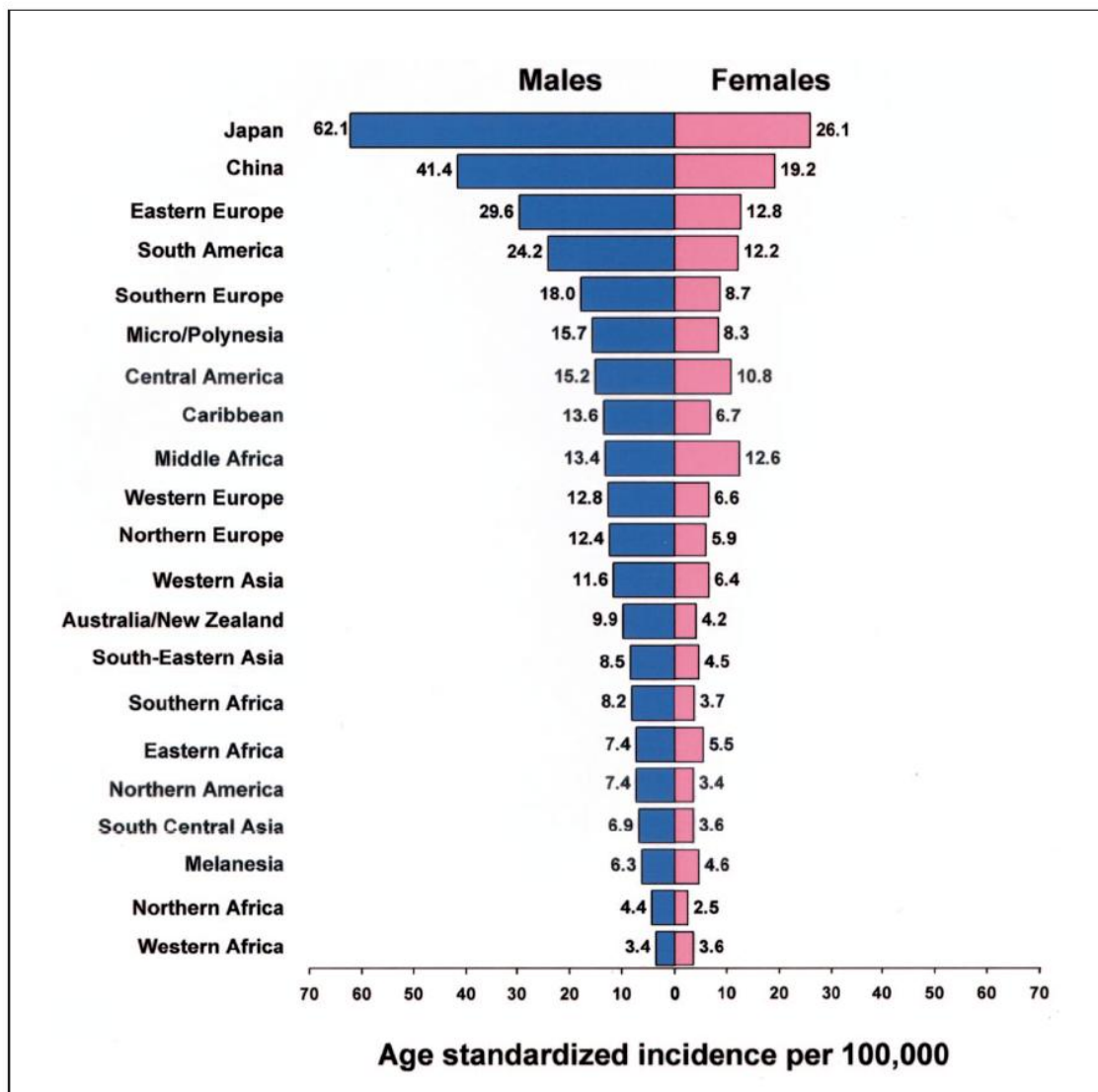


Figura 1. Incidências ajustadas à idade do carcinoma gástrico

Adaptado de Parkin, D.M., F Bray, et al., *Global cancer statistics, 2002*. *CA Cancer J Clin* 2005, **55**(2): 74-108.



Diferentes entidades clínico-patológicas de cancro gástrico

O adenocarcinoma representa cerca de 95% de todos os cancros do estômago, apresentando dois tipos histológicos principais, *segundo a classificação de Laurén*: tipo intestinal e tipo difuso [14]. Estes tipos histológicos estão associados a aspectos epidemiológicos, clínicos e patológicos distintos e a diferenças significativas na sobrevida dos doentes (Figura 2).

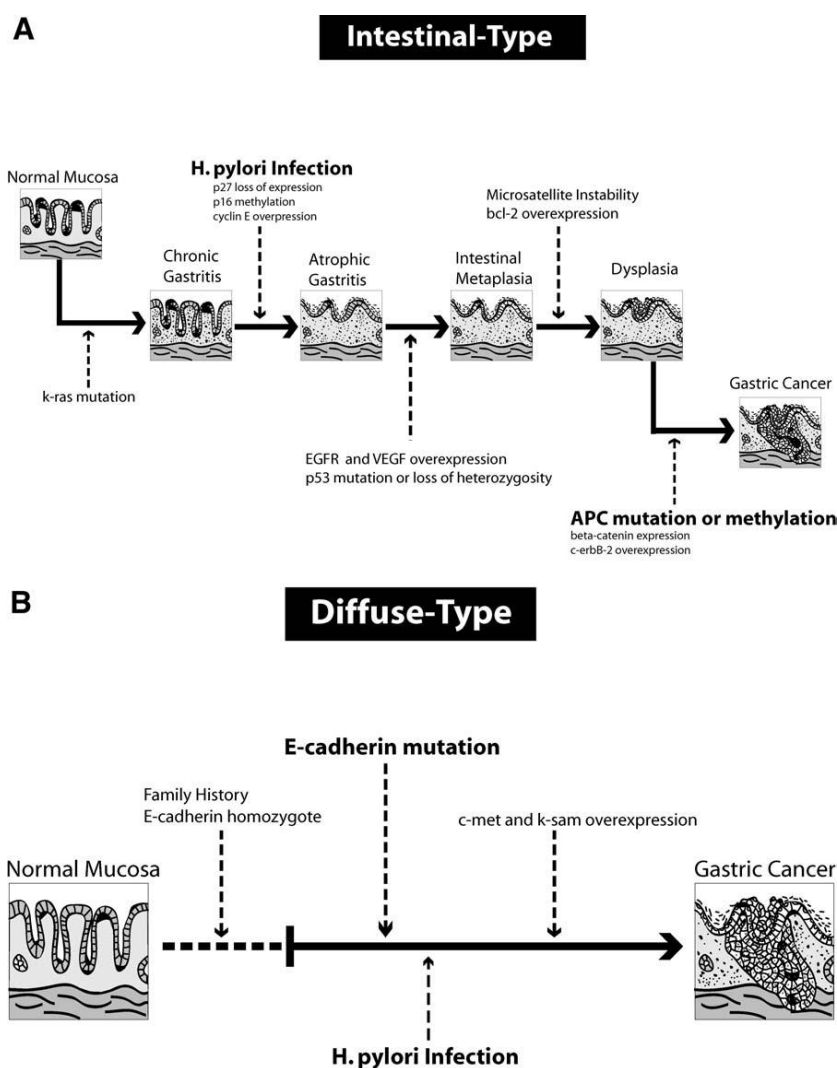


Figura 2. Diferentes vias na carcinogénese do carcinoma gástrico de tipo intestinal (A) e de tipo difuso (B)
Adaptado de Clark C.J. et al., *Current problems in surgery: gastric cancer.*, *Curr Probl Surg* 2006, **43**: 566-670

O carcinoma gástrico do tipo intestinal é mais frequente no sexo masculino (relação homem/mulher de 1,5 : 1) [1], na raça negra, nos grupos etários mais velhos, nas camadas socioeconómicas mais baixas e nos países em desenvolvimento [13], enquanto o carcinoma do tipo difuso tem uma relação homem/mulher mais próxima de 1 : 1 e é mais frequente nos grupos etários mais novos [5, 14]. Os adenocarcinomas gástricos de tipo difuso são mais frequentes em zonas endémicas, apresentam uma distribuição geográfica mais uniforme [15] e



a sua incidência, particularmente o tipo com células em anel de sinete, tem vindo a aumentar [16]. As lesões de tipo intestinal, que têm melhor prognóstico, são mais frequentes nas áreas com maior incidência de cancro gástrico, como o Japão. A diminuição da incidência dos tumores de tipo intestinal é responsável pela maior parte da diminuição do cancro gástrico a nível mundial [17].

É comum a designação de carcinoma gástrico englobar, quer os tumores distais (antro gástrico) quer os tumores proximais (da junção esófago-gástrica, JEG; e do fundo e corpo gástricos), no entanto existem estudos na literatura [18] que mostram a influência da localização tumoral no comportamento biológico dos carcinomas gástricos. Uma vez que apresentam diferentes perfis clínico-patológicos, os tumores mais proximais (JEG) e os carcinomas distais (antro) devem ser considerados entidades clínicas distintas.

Os homens são afectados cinco vezes mais do que as mulheres no cancro da JEG e os caucasianos o dobro das vezes comparativamente aos indivíduos da raça negra [19]. Nos últimos 30 anos, em contraste com a tendência global de diminuição da incidência, tem havido um aumento dos cancros gástricos proximais em diversas populações [20-21], particularmente no sexo masculino e nos países do Ocidente [22-23], onde a sua incidência aumentou 5 a 6 vezes [24-30]. Actualmente, cerca de metade de todos os cancros gástricos nos indivíduos do sexo masculino nos EUA e no Reino Unido ocorre nesta localização [5, 13, 22]. Apesar do aumento da incidência dos tumores gástricos proximais no Ocidente, os tumores distais continuam a predominar no Japão. No entanto, mesmo no Japão, a percentagem de tumores proximais tem aumentado no sexo masculino [31].

O principal marco epidemiológico do cancro gástrico é a diminuição progressiva da sua incidência, nas últimas décadas, na maioria dos países [32-34]. Os valores actuais de incidência ajustada à idade são cerca de 15% dos valores estimados em 1985 [35]. Se a diminuição observada continuar, o número de casos esperados para 2010 será cerca de 1,1 milhões, com um aumento de 19% dos casos, em vez dos 21% esperados devido ao aumento e envelhecimento da população [1].

Durante as últimas décadas, a mortalidade por cancro gástrico tem diminuído de uma forma marcada na maioria dos países [34, 36]. A queda na mortalidade tem ocorrido de uma forma ligeiramente superior à queda da incidência [37]. A diminuição, a nível mundial, da mortalidade por cancro gástrico começou na década de 1930, nos EUA [38], duas a três décadas mais tarde na Europa e Austrália [39] e só na década de 1970 em Portugal [39-40].

A diminuição da mortalidade do cancro gástrico ainda não é totalmente compreendida, mas provavelmente está dependente do efeito de uma dieta rica em frutas e vegetais frescos, da melhoria da conservação e do armazenamento dos alimentos, nomeadamente a refrigeração e a redução do uso dos produtos salgados e fumados [41-42], assim como da melhoria dos cuidados de higiene e a consequente diminuição da incidência da infecção por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) [43-45].



A importância do cancro gástrico a nível regional

Em 2004 foram diagnosticados 2.886.800 casos de cancro na Europa (54% no sexo masculino e 46% no sexo feminino) e ocorreram 1.711.000 mortes por cancro [46].

O cancro gástrico ocupa o quinto lugar dos cancros mais frequentes na Europa, a seguir ao cancro do pulmão (381.500 casos; 13,3% dos casos de cancro), colorectal (376.400; 13,2%), da mama (370.100; 12,8%) e da próstata, com uma incidência de 174.000 novos casos por ano, em 2002 (cerca de 6% dos casos de cancro) [1]. Em termos de mortalidade, ocupa o terceiro lugar (137.900 mortes; 8,1% das mortes por cancro), a seguir ao cancro do pulmão (341.800; 20%) e colo-rectal (203.700; 11,9%).

Existe uma variação geográfica marcada na incidência do cancro gástrico. A incidência anual ajustada à idade é superior na Europa de Leste (29.6/100.000 nos homens) e do Sul (18/100.000 nos homens) à registada na Europa do Norte (5.9/100.000 nas mulheres) e Ocidental (6.6/100.000 nas mulheres) [1]. Portugal apresentava a taxa de incidência mais elevada da União Europeia em 2000 (30.1 por 100.000 no sexo masculino e 15.0 por 100.000 no sexo feminino) [47] e a taxa de mortalidade ajustada à idade do cancro gástrico era de 19,35 por 100.000, no sexo masculino e de 8,91 por 100.000, no sexo feminino [48]. No entanto, existe uma variabilidade regional acentuada com taxas entre 18,4 e 42.9 por 100.000 no sexo masculino e entre 6.2 e 26.9 por 100.000 no sexo feminino (*dados de 1999*) [39].

Apesar da diminuição consistente das taxas de mortalidade na Europa nas últimas décadas, em Portugal observou-se apenas uma modesta redução [33, 39-40, 49-53]. Na União Europeia, a taxa de mortalidade ajustada à idade do cancro gástrico diminuiu cerca de 30% entre 1980 e 2000 [48]. A tendência para a diminuição da mortalidade do cancro gástrico (-2%/ano) observada em Portugal durante os últimos anos (1984-1999), sendo uma das menores da Europa, regista, no entanto uma variação regional entre -0,6% e -3,7%/ano, com algumas regiões apresentando um padrão idêntico ao da Europa Ocidental e outras com valores idênticos aos países com incidências mais elevadas [39]. Esta diminuição tem sido atribuída à melhoria nas condições socioeconómicas e não tanto a intervenções planeadas [41].

Sobrevida

Na globalidade, os países com taxas de incidência mais altas apresentam taxas de sobrevida melhores do que os países com taxas de incidência menores [54]. Este efeito deve-se principalmente a diferenças na sobrevida entre os tumores localizados no cárdia, que têm um prognóstico e uma taxa de mortalidade pós-operatória piores do que os tumores distais [55]. A sobrevida no Japão é razoável (52%) devido ao rastreio sistemático, inicialmente com estudo radiológico contrastado e com endoscopia desde a década de 60; na América do Norte registam-se valores na ordem dos 40%, uma vez que o diagnóstico mais precoce se deve ao elevado número de exames endoscópicos realizados por outros motivos, nomeadamente patologia gástrica benigna [1].



Na Europa, a sobrevida relativa do cancro gástrico em 2000-2002 [56] era baixa em ambos os sexos: 25% aos 5 anos, sendo relativamente melhor nos indivíduos com menos de 45 anos (35%), apesar do cancro gástrico ser raro neste grupo etário. A sobrevida vai diminuindo lentamente com o aumento da idade, havendo uma queda abrupta nos doentes com mais de 74 anos (19%)[3]. Quer a sobrevida aos 5 anos quer aos 10 anos, melhoraram na Europa no período entre 1991 e 2002. Os perfis das sobrevidas aos 5 e aos 10 anos são idênticos, no entanto a sobrevida aos 10 anos é ligeiramente menor (uma diferença de menos de 5%), o que aponta para uma tendência para as mortes ocorrerem principalmente nos primeiros 5 anos após o diagnóstico, apesar de algum risco persistir para além deste período [57].

Caracterização clínico-patológica e prognóstica do carcinoma gástrico

A compreensão da etiologia e dos factores de risco, da forma como se processa o diagnóstico e o tratamento, dos factores de prognóstico e dos padrões de recidiva do cancro gástrico desempenham um papel importante na procura de novas formas de diagnóstico precoce e de rastreio assim como de tratamento, tendo em vista a diminuição da mortalidade e a melhoria do prognóstico do cancro gástrico.

Etiologia e factores de risco

As populações que emigraram de países com elevada incidência de cancro gástrico para áreas com menor incidência apresentaram uma diminuição marcada no risco de desenvolvimento de cancro do estômago nas gerações seguintes. Nos japoneses que emigraram para os EUA, registou-se uma queda substancial do risco entre a geração que emigrou e os japoneses que nasceram nos EUA [58], com as gerações subsequentes a adquirirem um risco idêntico ao do país para onde emigraram [13, 59]. Estes dados confirmam a importância do ambiente na infância na determinação do risco [60].

Nutrição

Os alimentos e a nutrição desempenham um papel importante na prevenção e na etiologia do cancro gástrico. Recentemente a *World Cancer Research Fund* (WCRF) e o *American Institute for Cancer Research* (AICR) [61] concluíram que:

- Existe uma forte evidência de que os vegetais e a fruta protegem contra o cancro gástrico, provavelmente devido ao seu conteúdo em vitamina C [62]
- Existe também uma forte evidência de que o sal e os alimentos conservados em sal causam este tipo de cancro
- Existe uma evidência limitada de que os legumes, nomeadamente a soja, assim como os alimentos contendo selénio protegem contra o cancro gástrico.
- Existe também uma evidência limitada de que o chili, as carnes processadas, os produtos fumados e as carnes grelhadas sejam causas de cancro gástrico.

Tabaco

O projecto “*European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition* (EPIC)” [63] encontrou uma associação significativa entre o tabaco e o risco de cancro gástrico (*hazard*



ratio (HR) de 1.45, 1.7 e 1.8 para os antigos fumadores, fumadores do sexo masculino e fumadores do sexo feminino, respectivamente). O HR aumenta com a intensidade e duração da história de consumo de tabaco. Aproximadamente 18% dos cancros gástricos podem ser atribuídos ao tabaco [64]. A combinação entre o uso excessivo de tabaco (>20/dia) e de álcool (>5 ocasiões/14 dias) aumenta o risco de cancro gástrico em cerca de 5 vezes [64].

Helicobacter pylori

A infecção pelo bacilo gram negativo *H. pylori* é uma causa reconhecida de quase todos os cancros gástricos [65-68]. No entanto a infecção com *H. pylori* isoladamente não é suficiente para causar cancro gástrico [3].

O *H. pylori*, isolado pela primeira vez em 1982, foi reconhecido como carcinógeno humano tipo I (definitivo) pela *International Agency For Research On Cancer* (IARC) em 1994, embora os mecanismos de acção no complexo processo da carcinogénese gástrica não sejam totalmente conhecidos [69]. No modelo de carcinogénese gástrica de Correa (Figura 3), a infecção por *H. pylori* seria um dos factores que iniciaria a sequência progressiva de lesões gástricas desde gastrite crónica, gastrite atrófica, metaplasia intestinal, displasia e, finalmente, adenocarcinoma gástrico [70]. Os cofactores que determinam o risco de cancro gástrico nos indivíduos com infecção crónica por *H. pylori* são factores de virulência bacteriana e factores pró-inflamatórios do hospedeiro. As estirpes mais virulentas (cag A – cytotoxin-associated gene A) do *H. pylori* apresentam um risco aumentado de gastrite atrófica severa e cancro gástrico distal [71-76]. Nos países do Ocidente, cerca de 60% das infecções por *H. pylori* são cagA+ [77], enquanto no Japão esta percentagem chega quase aos 100% [78-79]. Os factores do hospedeiro com um risco elevado de cancro gástrico incluem polimorfismos genéticos que levam a uma expressão aumentada da citocina pró-inflamatória interleucina 1 β [80-81].

A infecção por *H. pylori* é adquirida durante a infância, provavelmente pela ingestão oral, e persiste ao longo da vida. A prevalência está relacionada com as condições socioeconómicas e com as condições de vida na infância, nomeadamente condições de higiene e sobrelotação [82-87]. Os países com elevada incidência de cancro gástrico têm, tipicamente, elevada prevalência de infecção por *H.*

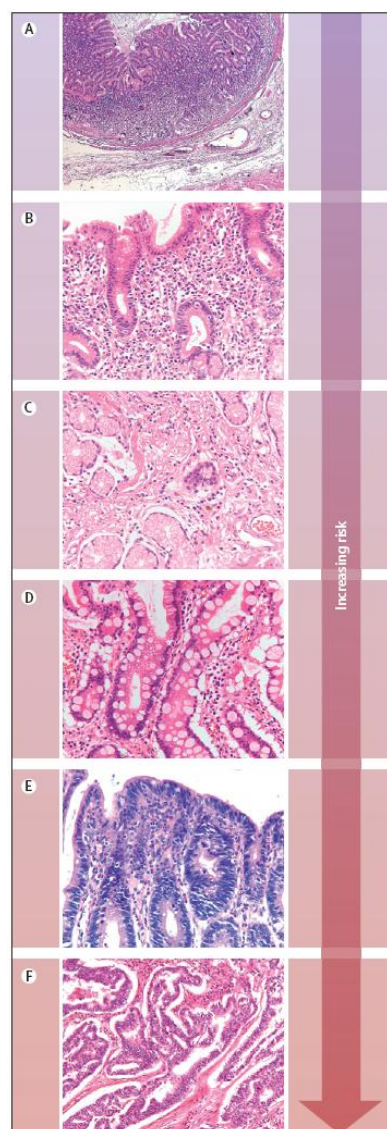


Figura 3. Sequência de Correa das lesões precursoras gástricas

A sequência mostra aumento do risco de desenvolvimento de carcinoma gástrico de tipo intestinal: (A) Mucosa normal;

Adaptado de Hartgrink, H.H., et al., *Gastric cancer*. *Lancet*, 2009. **374**(9688): p. 477-90.



pylori. Paralelamente, a diminuição da infecção por *H. pylori* nos países em desenvolvimento acompanha a diminuição da incidência de cancro gástrico (Figura 4) [41, 88].

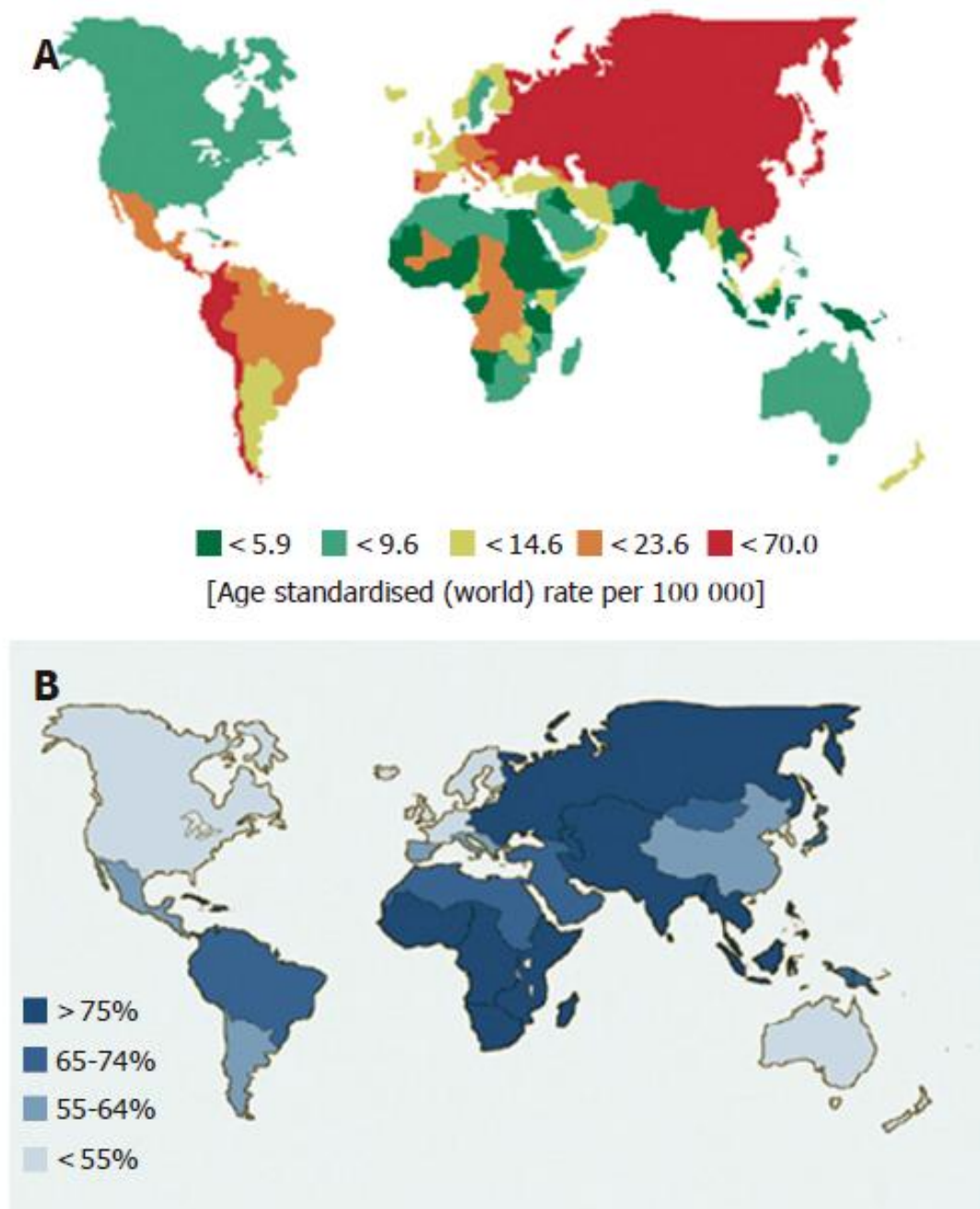


Figura 4. (A) Incidência de carcinoma gástrico no sexo masculino (B) Prevalência da infecção por *H. pylori* nos adultos assintomáticos

Adaptado de Parkin D.M., *International variation.. Oncogene* 2004, **23**: 6329-6340

A infecção por *H. pylori* não parece aumentar o risco de cancro da JEG [89-90], mas está associado a um aumento de 6 vezes do risco de desenvolvimento de cancro gástrico distal. Assumindo uma prevalência média de *H. pylori* de 35% nos países desenvolvidos e um risco de 6 vezes, cerca de 65% dos cancros gástricos distais podem ser atribuídos à infecção por *H. pylori*, e portanto, potencialmente preveníveis pelo controlo da infecção [69].



História familiar

Aproximadamente 10 a 15% dos cancros gástrico aparecem em indivíduos com história familiar deste tipo de neoplasia [91], particularmente nas síndromes genéticas como Lynch e Li-Fraumeni [92-94]. O risco está aumentado em 2 a 3 vezes nos descendentes dos doentes com este tipo de patologia [95].

Obesidade

A obesidade é um dos principais factores de risco do adenocarcinoma da JEG [96-97], pois promove a doença do refluxo gastroesofágico que predispõe para o esófago de Barrett, um precursor metaplásico do adenocarcinoma do esófago e da JEG [98-99].

Outros factores de risco

Os outros factores de risco menos comuns são a radiação [100], a anemia perniciosa [101], o tipo sanguíneo A [102], as cirurgias gástricas prévias por patologia benigna [103] e o vírus Epstein-Barr [104-106].

Diagnóstico

A maioria dos doentes com carcinoma gástrico nas fases precoces não apresenta sintomas. A principal razão para o diagnóstico tardio deste tipo de neoplasia é a presença de sintomas vagos e inespecíficos nestes doentes. No entanto, cerca de 30% dos doentes com carcinoma gástrico precoce - *early gastric cancer* (EGC) - apresentam uma história arrastada de dispepsia, que é indistinguível da doença ulcerosa péptica crónica [3]. A investigação dos doentes com mais de 40 anos e com queixas dispépticas pode aumentar a percentagem de EGC detectados para 26% e a proporção de casos ressecáveis para 63% [107].

Exames diagnósticos

A investigação diagnóstica pode ser realizada através de estudos radiológicos contrastados ou de endoscopia, apresentando ambos os exames uma especificidade similar [108]. As vantagens dos estudos contrastados são o baixo custo, a baixa incidência de efeitos laterais e de complicações, e a elevada sensibilidade (85 a 95%) [109]. No entanto, um problema crucial é a distinção entre úlcera benigna e maligna. O EGC pode apresentar sinais de úlcera benigna (extensão da cratera para além da parede gástrica e pregas desde as margens) e a cicatrização parcial pode até ocorrer numa percentagem próxima dos 70% dos casos [110]. A endoscopia digestiva alta é exame de escolha para o diagnóstico de cancro gástrico sintomático, mesmo que os estudos contrastados tenham sido realizados na avaliação inicial. A endoscopia é mais eficaz na avaliação da doença intraluminal, quer focal ou difusa, quer benigna ou maligna [3]. A sensibilidade da endoscopia com biópsia é de 95% [111-113], no entanto, menos de 5% de todas as úlceras gástricas diagnosticadas na endoscopia apresentam malignidade na biópsia [114-116].



Marcadores tumorais

Nos últimos anos, a investigação da patologia molecular ajudou a clarificar as alterações genéticas e epigenéticas relacionadas com o desenvolvimento e a progressão do cancro gástrico [117-118]. No entanto, os antigénios tumorais utilizados por rotina, quer séricos (CEA, CA 19.9, CA 72.4, CA 50) quer no suco gástrico (CEA, CA 19.9, sulfoglicoproteína fetal), não são eficazes no diagnóstico precoce [119]. Marcadores como o CEA e o CA 19.9 estão elevados em apenas 30 a 40% dos casos e os níveis estão significativamente elevados somente nos casos de doença avançada [120-123].

Early Gastric Cancer

Early gastric cancer é um termo originado no Japão e refere-se ao adenocarcinoma confinado à mucosa e submucosa independentemente da presença de metástases ganglionares [124].

A percentagem de EGC no Japão (30-50%) é superior à dos países ocidentais onde não são realizados programas de rastreio [125]; nos EUA, por exemplo, esta entidade representa apenas 6-8% de todos os cancros do estômago [126]. A importância da identificação correcta do EGC reside nos excelentes resultados alcançados com o tratamento cirúrgico ou endoscópico e no bom prognóstico destes doentes [3].

Nos doentes com tumores com dimensões inferiores a 2 cm, bem a moderadamente diferenciados, sem invasão da submucosa, sem invasão linfática ou venosa, a excisão local com ressecção endoscópica da mucosa (REM) tem sido o tratamento de escolha no Japão nos últimos 15 anos [127]. Os doentes submetidos a tratamento endoscópico apresentam sobrevidas aos 5 e aos 10 anos superiores a 95%. A incidência de recidiva local é de apenas 6% [128-129]. A erradicação profilática do *H. pylori* após a REM reduz o risco de desenvolvimento de tumores metácrónos [130]. A dissecação endoscópica da submucosa (DES) é uma nova técnica que consegue a remoção de tumores maiores numa peça única [131], com taxas de sobrevida livres de doença aos 3 anos de 97,6% (em comparação com 92,5% na REM) [132]. Num estudo com 5265 doentes, no qual foi analisada a metastização ganglionar [133], observou-se que os tumores bem diferenciados com dimensões inferiores a 3 cm, limitados à mucosa ou submucosa, apresentam um risco muito baixo de metastização ganglionar, assim como os tumores pouco diferenciados com dimensões inferiores a 2 cm, limitados à mucosa. O risco de metastização ganglionar aumenta com a progressão do tumor ao longo da parede gástrica. Para o EGC o risco é de 2 a 5% nos tumores limitados à mucosa e 11 a 20% nos tumores limitados à submucosa [134].



Tratamento

O tratamento loco-regional ideal para o cancro gástrico consiste na combinação entre o tratamento cirúrgico radical e o tratamento adjuvante e neo-adjuvante individualizado [135]. O tratamento cirúrgico como terapêutica única com intenção curativa apenas poderá ser aceitável nos doentes com tumores iniciais (EGC) [136].

Embora a cirurgia continue a ser o único meio terapêutico com capacidade para curar alguns doentes com carcinoma do estômago, apenas uma percentagem reduzida (ao contrário do que poderá ser sugerido pela avaliação clínica e imagiológica pré-operatória) apresenta a doença localizada, permitindo a cirurgia de ressecção com intenção curativa [137-141]. Deste modo, o prognóstico global do carcinoma do estômago continua muito sombrio [140, 142-144].

No Ocidente, apesar dos avanços nos meios auxiliares de diagnóstico pré-operatório, na técnica cirúrgica e nos cuidados de suporte peri e pós-operatórios, a sobrevida dos doentes submetidos a cirurgia de ressecção não tem aumentado, ou tem aumentado muito pouco nos últimos anos, mantendo-se distante dos valores que têm sido publicados em trabalhos oriundos de alguns centros japoneses [142, 145-147].

Na verdade, quer no Japão, quer nos países Ocidentais, muitos doentes com doença localmente avançada, submetidos a cirurgia de ressecção radical, recidivam e morrem nos primeiros 5 anos [148]. No entanto, existem diferenças significativas nas sobrevidas aos 5 anos entre os países asiáticos e os países ocidentais [149-150]. Várias razões podem explicar estas diferenças, nomeadamente, factores epidemiológicos e biológicos, sistemas de classificação e tratamento [151].

Relativamente aos factores epidemiológicos e biológicos, é de destacar, no Ocidente, o aumento da incidência do carcinoma proximal [17, 20-21, 23], o qual tem um prognóstico muito pior do que os tumores distais. Por outro lado, apesar da incidência do tipo difuso não apresentar grandes variações geográficas, o tipo intestinal, que tem um prognóstico melhor, é mais frequente nas regiões com maior incidência de cancro gástrico, como é o caso do Japão [17, 152], possivelmente devido à maior incidência de infecção por *H. pylori* e gastrite atrófica. As diferenças raciais ou nas defesas contra o tumor ainda não foram comprovadas em estudos [153-154]. As diferenças na sobrevida também são afectadas pelo facto dos doentes no Japão serem mais jovens e terem menos co-morbilidades, o que pode afectar a morbilidade e mortalidade operatória.

Existem importantes diferenças entre os sistemas de estadiamento utilizados no Oriente e no Ocidente, particularmente na classificação da metastização ganglionar. Enquanto os sistemas japoneses foram pensados principalmente para orientar os cirurgiões na extensão da linfadenectomia, os sistemas ocidentais foram concebidos tendo em conta a descrição patológica. Assim, relativamente à metastização ganglionar, a classificação japonesa baseia-se na avaliação topográfica das metástases ganglionares, com mapeamento meticuloso dos gânglios dissecados, enquanto o sistema TNM se baseia apenas no número de gânglios ressecados [3].



No que diz respeito ao tratamento com intenção curativa, a ressecção com linfadenectomia tipo D2 é o *gold standard* no Japão. Nos países Ocidentais, a linfadenectomia é normalmente menos alargada relativamente aos japoneses, sendo uma questão em debate se a linfadenectomia D2 terá benefícios em termos de sobrevida, especialmente se considerarmos a probabilidade de aumento de complicações relacionadas com este procedimento [3]. Uma revisão da Cochrane mostra um aumento significativo da mortalidade da linfadenectomia D2 (risco relativo de 2,23), sem benefício na sobrevida (HR 0.95) [155]. Um estudo randomizado [155] mostrou diferenças na sobrevida entre a linfadenectomia D1 e D3. Assim, a linfadenectomia D2 poderá ser benéfica se a mortalidade pós-operatória for evitada [156]. Vários estudos [157], três dos quais relativos a cancro gástrico [158-163] mostraram uma relação directa entre volume de cirurgias por ano em cada centro e a diminuição da mortalidade pós-operatória, que por sua vez se associa a uma melhoria da sobrevida.

As explicações sugeridas por outros autores para explicar a sobrevida superior no Japão relativamente aos países ocidentais são controversas e podem ser revistas em vários trabalhos [146, 164-168]. Continua por esclarecer se o carcinoma do estômago é ou não uma doença diferente no Oriente e no Ocidente. Independentemente da resposta para esta controvérsia, parece ser verdade que, globalmente, a sobrevida dos doentes japoneses com carcinoma do estômago é superior à dos doentes ocidentais. Desde logo, a maior percentagem relativa de carcinomas gástricos operados no Japão em fases iniciais da sua evolução clínica parece explicar estas diferenças de sobrevida [107, 169]. Porém, segundo alguns estudos, a sobrevida dos doentes no Oriente permanece significativamente superior, mesmo quando a comparação é feita entre tumores com o mesmo estadio. A maior agressividade cirúrgica verificada nos centros japoneses e coreanos poderá ser responsável por estas diferenças de sobrevida. No entanto, ainda não está encerrado o debate sobre se essas diferenças são devidas a uma maior radicalidade cirúrgica ou se são causadas por migrações de estadio que a maior radicalidade cirúrgica provoca [144, 170-173].

Factores de prognóstico

Os factores de prognóstico permitem identificar subgrupos de doentes com maior risco de recidiva e que eventualmente beneficiariam de outras opções terapêuticas. No carcinoma gástrico, apesar dos inúmeros estudos publicados, os factores de prognóstico até agora identificados não têm permitido clarificar correctamente quais os doentes que podem beneficiar desses tratamentos após a exérese cirúrgica [174].

O factor de prognóstico consensualmente mais importante é a remoção completa do tumor, ou seja uma ressecção do tipo R0. As ressecções do carcinoma gástrico são classificadas em três categorias, segundo a classificação R do estadiamento TNM [175-176]: R0 – remoção completa do tumor, sem tumor residual; R1 – tumor residual microscópico; R2 – tumor residual macroscópico. O tempo médio de sobrevida após ressecção R0 varia entre 35 e 75 meses [177] contrastando com uma sobrevida mediana de 7 a 11 meses, após ressecções R1 ou R2 [178].



O sistema utilizado para estadiar o carcinoma gástrico (TNM) [175-176] é constituído por três factores de prognóstico considerados independentes, relacionados com a extensão anatómica do tumor [140, 179]: o grau de penetração do tumor na parede (T), a presença de metastização ganglionar (N) e a presença de metástases à distância (M).

Num estudo prospectivo envolvendo 19 centros na Alemanha e na Áustria, realizado por Siewert e colaboradores para determinar os factores de prognóstico mais importantes no tratamento cirúrgico do carcinoma gástrico, ficou demonstrado que a metastização ganglionar e a ressecção R0 foram os principais factores independentes que influenciaram a sobrevida dos doentes [180]. Segundo um estudo de Takagane e colaboradores [181], a melhor forma de classificar a metastização ganglionar é através do rácio ganglionar (número de gânglios invadidos/número de gânglios estudados). Vários estudos mais recentes [182-188] confirmaram a superioridade do rácio ganglionar relativamente aos outros sistemas de classificação da metastização ganglionar e apontam-no como a melhor forma de diminuir a migração de estadio [184, 188], que poderá estar na origem das diferenças de prognóstico entre o Oriente e o Ocidente.

Além do tipo de ressecção cirúrgica e do estadiamento TNM, outros parâmetros clínicos e patológicos têm sido largamente estudados no sentido de estabelecer outros factores de prognóstico, mas por vezes os resultados têm sido contraditórios. Relativamente à idade, a maioria dos estudos revelam um pior prognóstico para doentes jovens com carcinoma gástrico [189], no entanto, outro estudo desenvolvido por Lo e colaboradores refere que os doentes com idade igual ou inferior a 39 anos não apresentam pior prognóstico do que os doentes mais idosos [190]. Estudos publicados associando o sexo com o prognóstico do carcinoma gástrico apresentam, igualmente, conclusões contraditórias [191], uma vez que, apesar de um estudo sugerir que as mulheres têm melhor prognóstico [192], este facto não foi confirmado por estudos posteriores [193]. Quanto à localização do tumor, investigações há que sugerem que carcinomas proximais (JEG, terço superior do estômago) apresentam pior prognóstico [18, 194-195]. A presença de permeação linfática, de invasão venosa e perineural têm sido apontadas como factores que agravam o prognóstico [18, 194, 196-198]. No que diz respeito ao tamanho do tumor, os estudos publicados conduziram a conclusões diversas [194]. O volume do tumor, medido a partir das secções do tumor através da análise computadorizada, parece ter algum significado prognóstico [199]. A presença de tumor nas margens de ressecção associa-se a um péssimo prognóstico [180, 200-204], com uma sobrevida aos 3 anos de 18% em comparação com os 63% dos doentes com margens negativas [202].

Os valores pré-operatórios de CEA parecem ter um valor preditivo na determinação do estadio e informação prognóstica nos doentes com carcinoma gástrico potencialmente ressecável [205]. Doentes com carcinoma gástrico ressecado com intenção curativa com níveis pré-operatórios de CEA mais elevados apresentam pior prognóstico do que os com níveis inferiores [122, 206-207]. Outros estudos mostraram que níveis elevados de CEA no lavado peritoneal durante a laparotomia também têm valor prognóstico [208-209].

Várias análises multivariadas demonstram a ausência de efeito no prognóstico do carcinoma gástrico da classificação histológica proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS), com excepção do carcinoma de pequenas células, o qual se associa a um prognóstico agravado. As



classificações propostas por Laurén (intestinal ou difuso) [14], Ming (expansivo ou infiltrativo) [210], Borrmann (forma macroscópica – I e II- polipóide e ulcerado com melhor prognóstico do que III e IV - infiltrativos) [211] e Carneiro e colaboradores têm sido consideradas [212], embora de forma inconsistente, como eventuais factores com impacto no prognóstico dos doentes [198, 213-218].

Num estudo de Maehara e colaboradores [219], a análise multivariada encontrou 10 factores de prognóstico independentes (profundidade da invasão, metastização ganglionar, dissecação ganglionar, tamanho, metastização hepática, disseminação peritoneal, invasão linfática, invasão venosa, lesão de todo o estômago e lesões no terço médio do estômago).

Factores de prognóstico moleculares

Nas últimas décadas, muitos estudos avaliaram o papel das alterações genéticas no desenvolvimento e progressão do cancro gástrico. [220]. A patologia molecular, não só é útil na compreensão da patogénese como pode ser importante no prognóstico [221].

Vários estudos têm procurado determinar o impacto da expressão das mucinas no prognóstico do carcinoma gástrico [222-225]. A expressão de MUC1 está elevada no carcinoma gástrico [222, 225] e outros autores demonstraram a associação entre a MUC1 e um pior prognóstico [223, 225]. A expressão de MUC5AC e de MUC6 está diminuída no cancro gástrico [222, 226] podendo traduzir uma perda de diferenciação. Alguns estudos apontam para um pior prognóstico nos doentes com expressão de MUC5AC [225, 227]. A MUC2 tem sido associada a uma expressão elevada nos carcinomas gástricos mucinosos [222, 225] e nos carcinomas do cárdia, relativamente às outras localizações [222].

O gene HER2/neu ou c-erb B2 [228] está localizado no cromossoma 17q12-q21.32 [228-229] e codifica um receptor de tirosina cinase transmembranar com 185 kD [230-231]. A amplificação génica, com aumento da expressão da proteína, é a alteração do c-erb B2 mais frequentemente encontrada nos carcinomas humanos [232-233]. Relativamente ao significado prognóstico da sobre-expressão do c-erb B2 no carcinoma gástrico, os estudos publicados são contraditórios. Apesar de em alguns estudos mais antigos a expressão de c-erb B2 não ter revelado qualquer influência na sobrevida dos doentes [234-236] [237], os estudos mais recentes confirmam o valor prognóstico da expressão de c-erb B2 no carcinoma gástrico [221, 238-252]. Estas diferenças devem-se ao facto de que nos estudos mais antigos, por um lado, na imunohistoquímica (IHQ) eram utilizados anticorpos policlonais e por outro, apenas era pesquisada a sobre-expressão na IHQ e não a amplificação do gene por hibridação *in situ* por imunofluorescência (FISH). Assim as recomendações actuais indicam que deverá ser realizada a análise por FISH nos casos da IHQ ser classificada como 1+ e 2+, com o intuito de evitar falsos negativos e falsos positivos, respectivamente [250].

O gene p53 é um gene de supressão tumoral localizado no cromossoma 17p, que codifica uma proteína de 53kD [253] e que tem um papel importante na regulação do ciclo celular, na reparação do ADN e na apoptose celular [248]. A proteína p53 normal tem uma semi-vida curta e é rapidamente removida do núcleo. Mas a p53 mutante (semi-vida mais prolongada)



acumula-se no núcleo levando à sobre-expressão de p53, a qual pode ser demonstrada por imunohistoquímica. Esta está presente em 17 a 91% dos tumores invasivos [254], enquanto a incidência de mutações do p53 nos carcinomas invasivos varia entre 0 e 77% [255-256]. A sua acumulação pode ser considerada um indicador da mutação do gene p53 [257]. Mutações neste gene têm sido documentadas em vários carcinomas humanos, como colo-rectal [258-259], mama [260], esófago [261-262] e estômago [263-265]. Apesar de vários estudos considerarem o p53 como um factor que influencia negativamente o prognóstico do carcinoma gástrico, os resultados são controversos e a sua relevância clínica no carcinoma gástrico ainda está por esclarecer [263, 266-272].

Outros factores de prognóstico moleculares propostos são a expressão de p21 [273], de VEGF [269], de EGF-r [274], de cyclin D2 [275], alterações na BAT-26 [276], UPA (*urokinase-type plasminogen activator*) e PAI-1 (*PA inhibitor*) [277-278], o nível sérico do receptor solúvel da IL2 (SolIL-2R) [279-280] e alguns factores relacionados com a proliferação, como a fracção fase S, Ki-67 ou PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) [281-286].

A correlação entre marcadores moleculares e a resposta à quimioterapia permanece por esclarecer [287]. Dois estudos mostraram a relação entre o p53 e a resposta à quimioterapia [288-289]. A expressão da sintase do timidilato parece estar relacionada com a resposta à quimioterapia [290-291].

Padrões de recidiva

A cirurgia de ressecção continua a ser o único tratamento curativo no carcinoma gástrico não disseminado. Apesar deste facto e das melhorias das condições peri-operatórias e da técnica cirúrgica, a sobrevida global aos 5 anos de doentes com carcinoma gástrico é de aproximadamente 20% [140, 142, 292] e a dos doentes submetidos a ressecção cirúrgica com intenção curativa é de 24 a 58% [293].

Uma das explicações possíveis prende-se com o facto de muitos doentes morrerem por recidiva do carcinoma gástrico, mesmo aqueles submetidos a ressecção com intenção curativa (40 a 60%) [294-295]. O carcinoma gástrico pode recidivar de várias formas, sendo as mais frequentes do tipo peritoneal, loco-regional (cerca de 75% no leito gástrico, seguida do coto gástrico, região peri-anastomótica, órgãos adjacentes e gânglios linfáticos regionais) e hematogénea (fígado, pulmões, ossos, cérebro e pele) [296-298].

A recidiva precoce é difícil de diagnosticar e, nestes casos, a probabilidade de sobrevida é reduzida [296-297]. Cerca de 75 a 80% das recidivas ocorrem nos primeiros 2 anos de *follow-up* e praticamente 98% nos primeiros 5 anos [294-295]. A recidiva loco-regional isolada acontece em 23-56% dos casos, enquanto a recidiva à distância isolada apenas acontece em 6% dos casos, uma vez que esta normalmente acontece no contexto de recidiva loco-regional avançada ou peritoneal, sendo o peritoneu e o fígado os locais mais frequentes de recidiva à distância. [294, 296, 299].



Alguns estudos japoneses revelam uma taxa de recidiva, após cirurgia potencialmente curativa, na ordem dos 40% [300-301]. Ikeda e colaboradores [302] revelaram que, mesmo no EGC, a taxa de recidiva foi de 2,8%, e Yoo e colaboradores demonstraram no seu estudo uma taxa de recidiva de 5,1% no carcinoma gástrico precoce [303].

Continua a ser difícil prever com precisão se um doente com carcinoma gástrico vai ou não apresentar recidiva. Uma vez que o tratamento cirúrgico potencialmente curativo não é, isoladamente, suficiente para prevenir a recidiva, outras formas de tratamento têm sido estudadas no sentido de complementar o tratamento cirúrgico. É o caso da quimioterapia intraperitoneal, quimioterapia neo-adjuvante, quimioterapia adjuvante, radioterapia adjuvante e a quimiorradioterapia adjuvante. No entanto, é necessário determinar quais são os factores de risco relevantes para o aparecimento da recidiva no carcinoma gástrico, no sentido de seleccionar criteriosamente os doentes a serem submetidos a estes tratamentos. Caso contrário, poderemos estar a submeter os doentes a tratamentos que não resultarão em qualquer benefício para o doente.

Vários estudos têm analisado parâmetros clínicos e patológicos com o objectivo de identificar quais é que influenciam a recidiva. No entanto, os resultados são ainda pouco consistentes, no que diz respeito ao estudo do papel de marcadores moleculares na recidiva do carcinoma gástrico. Em cerca de um terço dos doentes com recidiva, o doseamento do CEA e estudo imagiológico podem antecipar o início dos sintomas em 2 meses. No entanto, estes estudos diagnósticos não são utilizados por rotina no seguimento dos doentes pois não melhoraram a sobrevida relativamente ao seguimento apenas clínico [3].

O diagnóstico tardio da doença deve-se ao aparecimento de sintomas apenas quando já existiu uma progressão importante da doença, pelo que existe uma necessidade importante em desenvolver novas formas de detecção precoce e de rastreio eficaz das populações.

Prevenção e diagnóstico precoce

A prevenção e o tratamento personalizado são considerados as melhores opções para reduzir a mortalidade do cancro gástrico. As estratégias de prevenção deverão ser baseadas nos padrões de risco, nomeadamente o genótipo do *H. pylori*, os polimorfismos do hospedeiro, a presença de lesões precursoras e os factores ambientais [156]. Apesar da cirurgia continuar a ser o único tratamento passível de alcançar a cura, este tipo de tratamento isolado alcançou o efeito máximo para controlo local e da sobrevida [156]. Nos países ocidentais, mais de metade dos doentes com cancro ressecável acaba por falecer [304].

As estratégias de prevenção primária para redução do cancro gástrico incluem a melhoria das condições sanitárias, aumento do consumo de frutos e vegetais frescos, métodos seguros de conservação dos alimentos e diminuição do consumo de tabaco [156].



Os países com elevada incidência de cancro gástrico realizam programas de rastreio aos grupos de risco, no entanto não existe evidência clínica suficiente para a recomendação de rastreio endoscópico a nível mundial [305].

No Japão cerca de 6 milhões de pessoas são rastreadas anualmente através da realização de estudo radiológico contrastado [306] e endoscopia a partir dos 40 anos de idade [5]. O teste sérico do pepsinogénio, que é um método novo e potencialmente muito útil, foi introduzido como método de rastreio para identificação dos indivíduos com gastrite atrófica, os quais apresentam elevado risco de cancro gástrico [306]. Uma meta-análise realizada para validação do teste do pepsinogénio para rastreio do cancro gástrico, displasia ou gastrite atrófica crónica concluiu que outros estudos serão necessários para validação deste teste [307].

Os programas de rastreio nos países de elevado risco, como o Japão, levaram a uma diminuição marcada da mortalidade, em contraste com os EUA e a Europa, onde poucos cancros gástricos são diagnosticados em estádios precoces, pelo que a sobrevida aos 5 anos é menor [308].

Durante muitos anos, a erradicação do *H. pylori* e a vigilância das lesões precursoras para o diagnóstico precoce, foram consideradas as melhores atitudes para redução da mortalidade do cancro gástrico. No entanto, vários estudos mostram resultados contraditórios quanto à reversibilidade das lesões precursoras com erradicação do *H. pylori* [309].

O conhecimento das alterações moleculares das lesões precursoras pode ajudar na distinção entre pacientes com elevado risco e os com baixo risco, que beneficiariam mais da erradicação do *H. pylori*. Assim, programas de rastreio dirigidos aos subgrupos com elevado risco seriam vantajosos em termos de custo-benefício [156].

Alterações da O-glicosilação de proteínas

A expressão de mucinas no cancro gástrico

As mucinas são glicoproteínas de elevado peso molecular, que constituem o principal componente da camada de muco que protege o epitélio gástrico de agressões químicas e mecânicas [222]. Os genes das mucinas são expressos de forma regulada, com especificidade celular e tecidual [310-311]. O estômago é um bom exemplo da expressão diferencial dos genes das mucinas [222]. A MUC1 e MUC5AC são expressas no epitélio foveolar superficial e a MUC6 é expressa nas células mucosas do colo na região do corpo e nas glândulas pilóricas do antro [310, 312-313]. A MUC2 é uma mucina intestinal que não é normalmente expressa na mucosa gástrica normal. A expressão de mucinas no carcinoma gástrico é heterogénea. Inclui mucinas normalmente expressas na mucosa gástrica (MUC1, MUC5AC e MUC6) e a expressão, de novo, da mucina intestinal MUC2 [226, 310-312, 314-317].



Alterações na glicosilação das proteínas no cancro gástrico

A glicosilação é a modificação pós-tradução mais frequente das proteínas e está associada com vários aspectos quer fisiológicos, quer patológicos, como: interacção entre agente patogénico e hospedeiro, diferenciação, migração, invasão e metastização tumorais, tráfego e sinalização celulares [318]. As alterações, quer nos glicolipídios, quer nas glicoproteínas estão associadas a cancro [319-320].

A glicosilação de proteínas pode ocorrer sobre duas formas, *N*- e *O*- glicosilação de acordo com o resíduo aminoacídico ao qual os açúcares se ligam, e quer os *N*-glicanos, quer os *O*-glicanos que são sintetizados, podem estar afectados durante a progressão tumoral.

O-Glicosilação

A glicosilação é a ligação covalente de açúcares a proteínas, lipídios ou outro componente orgânico, enzimaticamente controlada, utilizando como substrato, dadores específicos de açúcares (Figura 5).

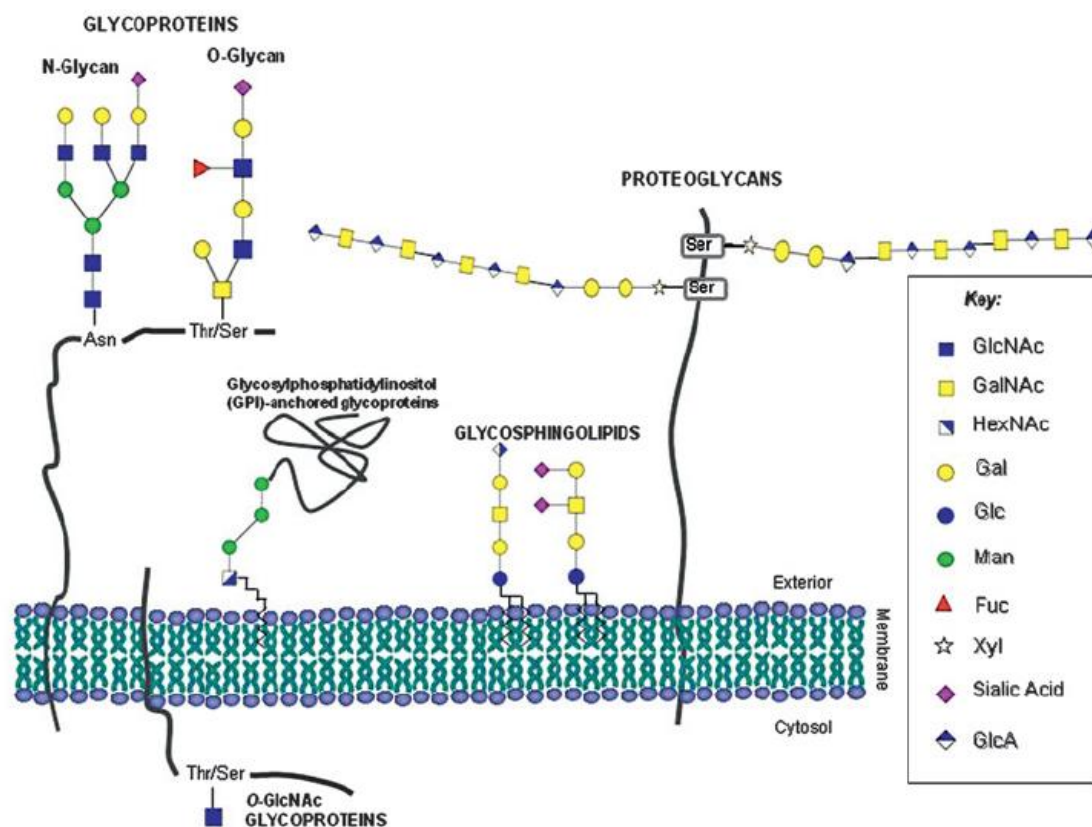


Figura 5. Representação esquemática das classes mais comuns de glicoconjugados expressos nas células humanas. A *O*-glicosilação e a *N*-glicosilação das proteínas podem ocorrer em glicoproteínas, quer associadas às membranas, quer segregadas.

Adaptado de Reis, C.A., et al., *Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection. J Clin Pathol*, 2010. **63**(4): p. 322-9.



A *O*-glicosilação consiste na ligação de um açúcar, mais frequentemente *N*-acetilgalactosamina (GalNAc), a grupos hidroxilo presentes em resíduos de serina ou treonina (Figura 6). A frequência de *O*-glicosilação das proteínas é elevada, particularmente nas mucinas associadas às membranas e nas segregadas, porque são ricas em resíduos de serina e treonina [321]. O primeiro passo da *O*-glicosilação das mucinas é a transferência de GalNAc do dador de açúcares uridina difosfato *N*-acetilgalactosamina (UDP-GalNAc) para um resíduo de serina ou de treonina, a qual é controlada pelas *UDPGalNAc-polipeptídeo N-acetilgalactosaminil-transferases* (ppGalNAc-Ts) [322-324], havendo 15 transferases diferentes [325-338]. A expressão alterada de pp-GalNAc-Ts pode ser um dos mecanismos envolvidos nas alterações da *O*-glicosilação das mucinas durante a transformação maligna [339-344].

O segundo nível de complexidade da *O*-glicosilação das mucinas é o processamento das cadeias de carboidratos por outras glicosiltransferases. Após a adição do primeiro glicano (GalNAc) com a formação do antígeno *Tn*, a estrutura *core* 1 (o antígeno *T*) é sintetizada pela Gal-transferase (C1GalT-1), que adiciona Gal ao GalNAc. Alternativamente, os antígenos *T* e *Tn* podem ser sialilados pelas sialiltransferases formando os antígenos *sialil-Tn* (STn), *sialil-T* (ST) e *disialil-T* [345-348]. A formação do antígeno STn pára o processamento da cadeia oligossacarídea [345-346, 349], estando a sua presença associada a diversas patologias (metaplasia e carcinoma, entre outros) (Figura 6). Outra estrutura nuclear comum nas células normais é o *core* 2 (Figura 6), que resulta da ligação de uma *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) ramificada ao *core* 1, através da acção da *core* 2 β 1-6 *N*-acetilglucosaminiltransferase (C2GnT) [350-351], que só é encontrada em células secretoras de mucinas [352-353], podendo estar alterada em alguns tumores. O prolongamento das estruturas nucleares é catalisado pelas β 1-3/4-galactosiltransferases (β 3/4 Gal-Ts) e β 1-3/4-*N*-acetilglucosaminiltransferases (β 3/4 Gn-Ts), levando à formação das cadeias tipo 1 e 2 (Figura 6). Os antígenos dos grupos sanguíneos Lewis e ABO são estruturas terminais comuns presentes nas mucinas e em outros glicoconjugados [318].

Alterações na O-glicosilação de proteínas no cancro

A alteração da glicosilação dos glicolípidos da superfície celular, das glicoproteínas associadas às membranas e das glicoproteínas segregadas é uma modificação quase universal no cancro [354]. Estas alterações foram inicialmente descritas através da demonstração de que anticorpos contra as células cancerígenas reconheciam frequentemente glicanos aberrantes [355]. Estas alterações na glicosilação podem contribuir desde as fases precoces da carcinogénese até à invasão e metastização [320, 356-358].

As mucinas são os principais portadores de carboidratos associados a carcinomas, nomeadamente de formas truncadas (imaturas) de oligossacarídeos e de estruturas terminais menos usuais (formas sialiladas) (Figura 6). Estas modificações são devidas a alterações na expressão das glicotransferases, sendo relativamente estáveis na progressão da carcinogénese [359], provavelmente devido à selecção positiva que exercem nas populações celulares, facilitando a invasão e a metastização.



As alterações da glicosilação são um potencial alvo para a descoberta de biomarcadores, pois estas acontecem na superfície das células cancerígenas (acessíveis a anticorpos ou lectinas como biomarcadores teciduais) e são expressas na circulação após terem sido secretadas (biomarcadores séricos) [318].

Um exemplo disto é o reconhecimento diferencial da mucina MUC1 por diferentes anticorpos, dependendo da glicosilação [360]. As mucinas apresentam uma expressão restrita e específica para um tecido nas células epiteliais normais, mas manifestam uma sobre-expressão e uma expressão aberrante no cancro. Como exemplo disto, a mucina MUC2, que é normalmente expressa no intestino normal, revela uma expressão aberrante na metaplasia intestinal que é um precursor do carcinoma gástrico [361] e em 25% dos carcinomas gástricos [226, 362].

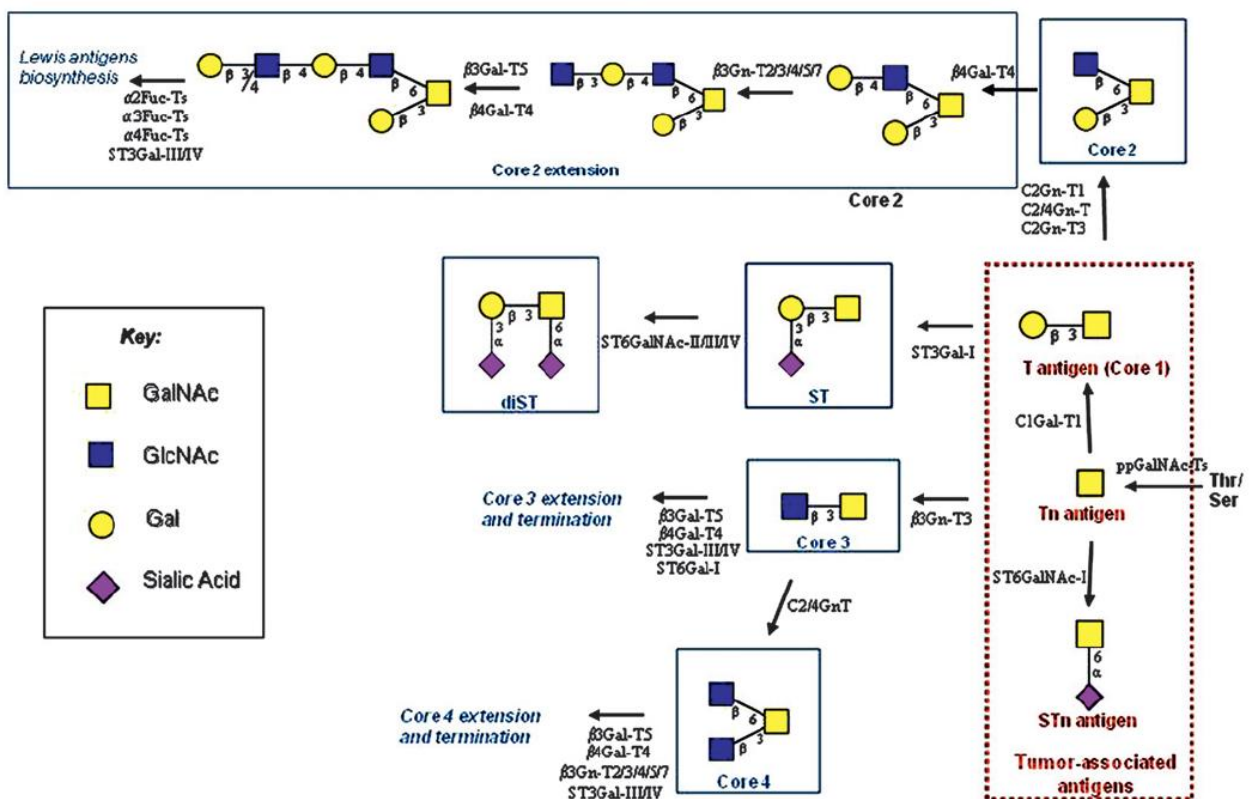


Figura 6. Representação esquemática das vias de biossíntese dos O-glicanos das mucinas mais comuns. As glicosiltransferases envolvidas em cada reacção enzimática estão indicadas. Os principais antigénios associados a tumores estão em destaque.

β 3Gal-T, β 1-3-galactosiltransferase; β 4Gal-T, β 1-4-galactosiltransferase; β 3Gn-T, β 1-3-N-acetilglucosaminiltransferase; C1Gal-T1, core 1 β 1-3-galactosiltransferase; C2GnT, core 2 β 1-6-N-acetilglucosaminiltransferase; ppGalNAc-T, UDOGalNAc-polipeptideo N-acetilgalactosaminiltransferase; ST3Gal, α 2,3-sialiltransferase; ST6GalNAc-T, GalNAc α 2,6-sialiltransferase

Adaptado de Reis, C.A., et al., *Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection. J Clin Pathol*, 2010. **63**(4): p. 322-9.



Antigénios de carboidratos simples das mucinas

Uma das modificações associadas ao cancro mais comum é a glicosilação alterada de glicoproteínas, que origina a expressão de *O*-glicanos truncados à superfície da célula [362-365] (Figura 5). É o caso dos antigénios *Tn*, *STn* e *T* (Figura 6), que estão presentes na maioria dos tumores [366-367]. Vários estudos mostraram a expressão aberrante dos antigénios simples das mucinas em carcinomas da mama [368], do esófago [369], do cólon [370], do pâncreas [371-372], do estômago [359], do pulmão [373], do endométrio [374-375], do ovário [376] e da bexiga [377]. Outros estudos mostraram ainda a associação da expressão destes antigénios com pior prognóstico em doentes com carcinoma da mama [378], do cólon [379] e do estômago [380-381].

Antigénios de carboidratos do tipo Lewis

Os antigénios do tipo Lewis, como o *sialil Lewis A* (SLe^a) e o *sialil Lewis X* (SLe^x) (Figura 7) são expressos nas células malignas, mimetizando a sua expressão normal nas células sanguíneas e o seu potencial para migração através da ligação às selectinas endoteliais. São expressos nas cadeias de carboidratos tipo 1 e 2, conforme a ligação da galactose e GlcNAc, $\beta 1,3$ e $\beta 1,4$, respectivamente. A $\alpha 1,2$ -fucosiltransferase, produto do gene secretor (*Se*), actua na galactose terminal do antigénio Lewis tipo 1, originando a estrutura H tipo 1, que por sua vez, é o substrato da $\alpha 1,4$ -fucosiltransferase, que é o produto do gene Lewis (*Le*), originando o antigénio Le^b difucosilado (Figura 7). As pessoas com mutações que inativem o gene *Se*, são incapazes de sintetizar os antigénios *H tipo 1* e Le^b , pelo que são designadas de não-secretoras e representam cerca de 20% da população. O estado secretor e Lewis dos indivíduos está implicado na susceptibilidade a diversas doenças, na maioria dos casos infecções, com uma ausência quase completa de infecções gastrointestinais por calicivirus nos não-secretores [382], e uma influência na infecção por *H. pylori* BabA+ [383].

A importância das estruturas Lewis sialiladas no cancro foi demonstrada nos anos 80, quando se verificou que anticorpos monoclonais contra células tumorais reconheciam $SLe^{a/x}$ [384-386]. A biossíntese destes antigénios depende do aumento da actividade da $\alpha 2,3$ -sialiltransferase e da $\alpha 1,3/4$ -fucosiltransferase [387-388].

As mucinas podem ser portadoras destas estruturas [389], tendo-se identificado especificamente a MUC1 como sendo uma delas [390]. Em 1991 foi demonstrado que o SLe^a e SLe^x são reconhecidos pela ELAM-1 das células endoteliais [391] e que as células cancerígenas utilizam estas estruturas para aderirem às células endoteliais activadas [392], facilitando assim a disseminação hematogénea e, por conseguinte, a metastização à distância. A sobre-expressão de SLe^x e SLe^o , comum a vários carcinomas (pulmão, cólon, estômago e pâncreas), está associada à capacidade metastática aumentada por parte dos tumores [393-396], logo a um pior prognóstico dos doentes [397-401].

Assim, a importância dos antigénios SLe^x e SLe^o na disseminação tumoral levou à sua utilização, não só na descoberta de novos biomarcadores, mas também como alvos terapêuticos [402-404].



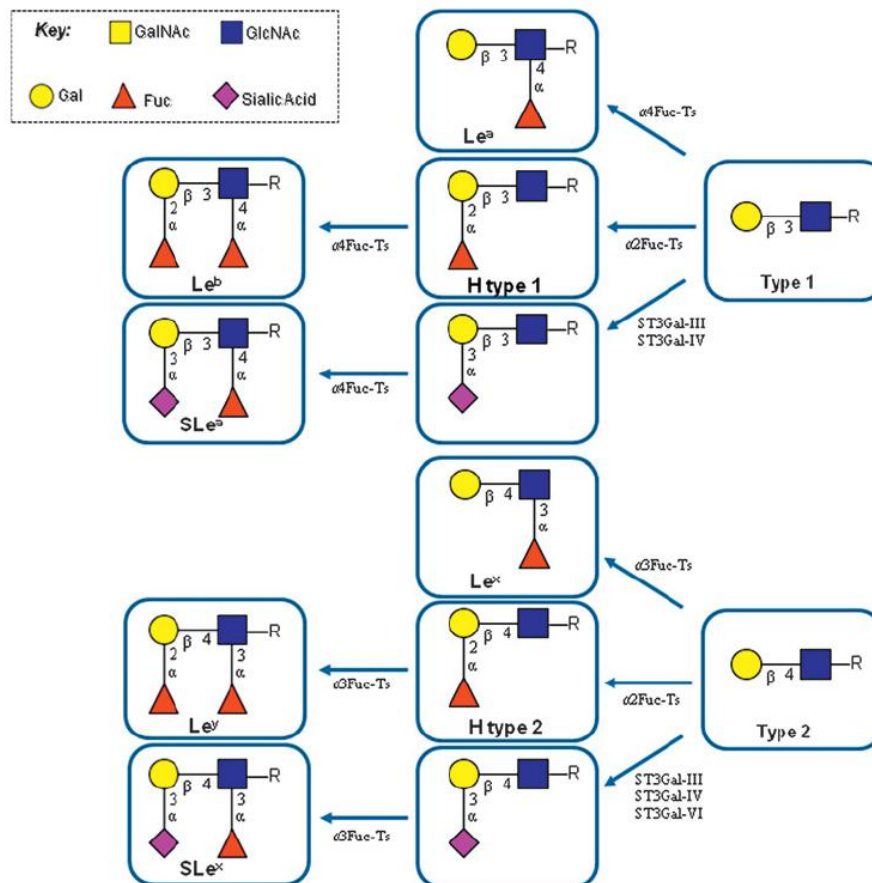


Figura 7. Representação esquemática da biossíntese dos antígenos Lewis.

R representa a cadeia do carbohidrato precursor. Fuc-T, fucosiltransferase; Le^a, Lewis A; Le^b, Lewis B; Le^x, Lewis X; Le^y, Lewis Y; SLe^a, sialil Lewis A; SLe^x, sialil Lewis X; ST3Gal, α2,3-sialiltransferase

Adaptado de Reis, C.A., et al., *Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection. J Clin Pathol*, 2010. **63**(4): p. 322-9.

Biomarcadores de cancro baseados nas alterações da glicosilação

As alterações da glicosilação dos glicoconjugados presentes, quer na superfície celular, quer segregados pelas células tumorais, são uma fonte potencial de biomarcadores de cancro. Na actualidade, a maioria dos marcadores serológicos utilizados na detecção, prognóstico e monitorização do cancro são baseados na quantificação de glicoconjugados no soro dos doentes com cancro. Estes testes serológicos detectam antígenos de carbohidratos como o SLe^a (CA 19-9) e o STn (CA72-4) ou de glicoproteínas, nomeadamente as mucinas, como a MUC1 (CA15-3) e a MUC16 (CA125) [405-407].

A utilização destes biomarcadores no rastreio do cancro é limitada, devido à sua expressão em vários tipos de tumores, que impossibilita a identificação do órgão que está na origem do mesmo. [408-410]. Para além disto, tais biomarcadores podem ser produzidos por patologias não-neoplásicas, nomeadamente patologias inflamatórias [411], o que reduz a sua especificidade no rastreio do cancro [412]. No entanto, existe uma evidência científica para a utilização do CA125 na detecção do cancro de ovário. Níveis elevados do CA125 são



encontrados em 50% das doentes com cancro do ovário, estágio I, e em 25% das amostras sanguíneas colhidas até 5 anos antes do diagnóstico [413].

A detecção destes biomarcadores no soro dos doentes com cancro tem-se mostrado de particular interesse na avaliação prognóstica e na monitorização dos tumores. Por exemplo, o CA125 é detectado em 80% das doentes com cancro do ovário [405] e o seu aumento ou diminuição correlaciona-se com a progressão ou regressão da doença, respectivamente. Deste modo, o valor pré-operatório de CA125 pode ser utilizado na avaliação do prognóstico deste tipo de cancro [414-415].

A forma aberrante glicosilada da MUC1 que é produzida pelas células cancerígenas e libertada para a circulação, é detectada pelo teste do CA15-3. Níveis elevados do CA15-3 mostraram-se úteis na avaliação prognóstica do cancro da mama precoce e na monitorização da progressão da doença [416-418], nomeadamente nos doentes com doença metastática com tratamento activo [419]. Na ausência de doença mensurável, um aumento do CA15-3 pode indicar falência do tratamento [412, 420].

A detecção do SLe^a nos glicolípidos ou nas glicoproteínas pelo teste do CA19-9 é utilizada nos doentes com diagnóstico estabelecido de cancro pancreático, colo-rectal, gástrico e das vias biliares, para monitorizar a resposta clínica ao tratamento [421-422]. No cancro do cólon, um valor elevado do CA19-9 antes da cirurgia é um factor de prognóstico independente (aumento de 4 vezes na taxa de mortalidade aos 3 anos).

No carcinoma gástrico, o valor pré-operatório do CA19-9 continua a ser um dos melhores factores de prognóstico [423-424], constituindo um nível elevado no pré-operatório, um factor de risco independente para a recidiva [425]. Outro antigénio de carboidratos, o STn, que é expresso nas glicoproteínas como as mucinas, pode ser detectado pelo teste do CA72-4. Níveis elevados de CA72-4 são detectados em doentes com cancro gástrico, colo-rectal e pancreático [424, 426]. No carcinoma pancreático o CA72-4 tem sido apontado como um factor de prognóstico independente, ocorrendo o mesmo no cancro gástrico, com um aumento de 3,8 vezes do risco de morte no caso deste último [427]. Quanto ao carcinoma gástrico, tem, ainda, sido útil na sua monitorização, como predictivo de recidiva [424].

O antigénio carcinogénico embrionário (CEA) é outro teste serológico utilizado na clínica, uma vez que as glicoproteínas do CEA são ricas em *N*-glicanos, que podem ser produzidos tanto pelas células normais como pelas tumorais. No cancro colo-rectal, assim como noutros tumores, o CEA é expresso e libertado para a circulação [417-419]. A utilidade clínica do CEA no cancro colo-rectal é a avaliação prognóstica e o seguimento dos doentes [428-429]. No entanto, níveis elevados do CEA são encontrados em outras patologias não-neoplásicas [430]. Devido à falta de sensibilidade nos estádios precoces do cancro colo-rectal, o CEA não é apropriado para o rastreio populacional.

As alterações da glicosilação observadas no cancro, particularmente os glicanos específicos, constituem o principal alvo para o desenvolvimento de novos testes serológicos para a detecção precoce do cancro, com importantes implicações no rastreio e na clínica [318].



OBJECTIVOS

No contexto da enorme importância epidemiológica, clínica, patológica e social do carcinoma do estômago em Portugal, dada a dificuldade em encontrar dados credíveis na literatura que documentem a realidade portuguesa e na impossibilidade imediata de reunir dados de todos os representantes dos centros que recebem e tratam doentes com carcinoma do estômago, um dos caminhos com interesse é o estudo das populações tratadas nas várias instituições hospitalares. Assim, a análise crítica dos resultados conseguidos, ao longo das duas últimas décadas, num hospital central afigura-se-nos um passo fundamental para o avanço na melhoria dos cuidados assistenciais dos doentes com carcinoma do estômago.

O diagnóstico tardio da doença deve-se ao aparecimento de sintomas apenas quando já existiu uma progressão importante da doença, pelo que existe uma necessidade importante em desenvolver novas formas de detecção precoce e de rastreio eficaz das populações.

A maioria dos biomarcadores é baseada na expressão de novos antígenos pelas células tumorais. A detecção no soro destes componentes depende da produção pelas células neoplásicas e sua libertação para a corrente sanguínea, o que acontece tipicamente nas fases mais tardias da doença. No entanto, existem componentes produzidos pelo sistema imunitário do doente em resposta ao tumor, nomeadamente anticorpos, nas fases precoces da doença. As células neoplásicas apresentam frequentemente alterações na glicosilação, que resultam na expressão de *O*-glicanos truncados ligados a proteínas, incluindo as mucinas, e de formas sialiladas dos antígenos do tipo Lewis.

Caracterização clínico-patológica e prognóstica do carcinoma gástrico: A evolução da nossa realidade

O estudo da epidemiologia, do perfil clínico-patológico e do prognóstico do carcinoma gástrico, procurou conduzir à obtenção dos seguintes objectivos:

- Caracterização clínico-patológico e molecular do carcinoma gástrico nas duas últimas décadas
- Análise da sobrevida de acordo com os parâmetros clínico-patológicos e moleculares
- Identificação de factores de prognóstico
- Definição do perfil clínico-patológico do carcinoma gástrico, de acordo com a sua evolução ao longo do tempo
- Análise da sobrevida de acordo com os parâmetros clínico-patológicos e moleculares nos diferentes períodos do estudo
- Caracterização clínico-patológica dos EGC e dos carcinomas nos indivíduos jovens (*Early onset gastric cancer, EOGC*)
- Caracterização clínico-patológica de acordo com a classificação de Laurén e com a localização tumoral



Alterações da *O*-glicosilação das proteínas: Biomarcadores para diagnóstico precoce de carcinoma gástrico

O estudo das alterações da *O*-glicosilação das proteínas nos doentes com carcinoma gástrico teve os seguintes objectivos:

- Caracterização nos carcinomas gástricos ressecados do padrão imunohistoquímico das formas alteradas de carboidratos associadas a cancro, nomeadamente dos antígenos de carboidratos simples das mucinas, e dos antígenos de carboidratos do tipo Lewis
- Análise comparativa univariada dos vários parâmetros clínico-patológicos, de acordo com os diferentes padrões de expressão dos antígenos estudados



MATERIAL E MÉTODOS

O estudo apresentado neste trabalho dividiu-se em duas fases sequenciais:

1. Caracterização clínico-patológica e prognóstica do carcinoma gástrico e a sua evolução ao longo do tempo
2. Estudo das alterações da *O*-glicosilação das proteínas, tendo em vista a identificação de biomarcadores para diagnóstico precoce de carcinoma gástrico

Cada uma das etapas decorreu de acordo com metodologia própria que será explicada separadamente, no entanto, alguns aspectos comuns, nomeadamente os que dizem respeito aos parâmetros clínico-patológicos e à análise estatística, serão descritos progressivamente de forma mais sintética.

Caracterização clínico-patológica e prognóstica do carcinoma gástrico: A evolução da nossa realidade

Nos Serviços de Cirurgia 4 (até Fevereiro de 2002), de Cirurgia B (entre Fevereiro de 2002 e Maio de 2006) e de Cirurgia Geral (desde Maio de 2006) do Hospital São João EPE, 1272 doentes com carcinoma do estômago ou da JEG foram tratados entre Janeiro de 1988 e Dezembro de 2008.

Todos os doentes apresentavam adenocarcinoma documentado em biópsia, no caso dos carcinomas irresssecáveis, ou em peça de ressecção cirúrgica, no caso dos carcinomas ressecáveis. Todos os casos de carcinoma foram analisados e revistos no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital São João EPE.

A informação relativa aos doentes estudados está registada numa base de dados informatizada da Unidade de Patologia Esofago-Gástrica do Serviço de Cirurgia Geral do Hospital São João EPE.

Nesta fase do estudo foram avaliados os vários parâmetros clínicos indicados na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros clínicos do carcinoma gástrico

Idade
Sexo
Localização Tumoral
Ressecabilidade
Tipo de Cirurgia de Ressecção
Tipo de Ressecção
Linfadenectomia
Siewert
Japonesa
Número de gânglios estudados

A idade foi avaliada com variável contínua e na análise univariada como variável categorial, de acordo com a definição de EOGC: idade inferior ou igual a 45 anos e superior a 45 anos.



Os carcinomas foram considerados da JEG de acordo com a classificação proposta por Siewert e Stein [431]. Os tumores do estômago foram divididos em duas localizações – antro e fundo/corpo – segundo critérios previamente definidos [18].

Os tumores do tipo I da JEG, que são adenocarcinomas do esófago distal que invadem a JEG, foram submetidos a esofagectomia subtotal e esofago-gastroplastia por laparotomia mediana e toracotomia direita (operação de Ivor-Lewis). Os carcinomas do tipo II, que são designados como os verdadeiros tumores da JEG, e os do tipo III, que ocupam a região subcárdica e que invadem a JEG, foram submetidos a gastrectomia total e esofagectomia distal associada a esplenectomia, por toracofrenolaparotomia esquerda (operação de Lortat-Jacob), e em casos selecionados, por via trans-hiatal.

Os carcinomas do fundo ou do corpo foram submetidos a gastrectomia total e esofagojejunostomia do tipo Y-de-Roux. A esplenectomia foi realizada nos carcinomas do fundo. Os carcinomas do antro foram submetidos a gastrectomia subtotal distal e gastrojejunostomia do tipo Bilroth II. Os doentes com carcinomas de células isoladas foram submetidos a gastrectomia total, independentemente da sua localização no estômago. Os doentes com gastrectomia subtotal prévia foram submetidos a degastrogastrectomia.

A classificação R do estadiamento segundo a classificação TNM de 2009 [175-176], classifica as ressecções do carcinoma gástrico em 3 categorias: R0 – remoção completa do tumor, sem tumor residual; R1 – tumor residual microscópico; R2 – tumor residual macroscópico.

O tipo de linfadenectomia foi definido segundo a classificação de Siewert [432] e segundo a *Japanese Gastric Cancer Association* (JGCA) [433].

Siewert e colaboradores definiram o tipo de linfadenectomia de acordo com o número de gânglios ressecados: 25 ou menos gânglios (D1) e mais de 25 gânglios (D2).

A classificação Japonesa agrupa os gânglios regionais linfáticos em várias regiões topográficas ou estações ganglionares; dependendo das estações ganglionares envolvidas e da localização do tumor as linfadenectomias são classificadas em D1, D2, D3 e D4.

De uma maneira geral, as linfadenectomias D1 envolvem os gânglios perigástricos ao longo da pequena e da grande curvatura (estações 1-6; nível 1); as linfadenectomias D2 (nível 2) exigem a remoção de gânglios do primeiro e do segundo níveis [ao longo da artéria gástrica esquerda (estação 7), da artéria hepática comum (estação 8), do tronco celíaco (estação 9) e do hilo e da artéria esplénicos (estação 10 e 11)]; as linfadenectomias D3 (nível 3) incluem a dissecação dos gânglios previamente descritos e do ligamento hepatoduodenal (estação 12), da face posterior da cabeça do pâncreas (estação 13) e do mesentério (estação 14); finalmente, as linfadenectomias D4 implicam a exérese dos gânglios ao longo dos vasos cólicos médios (estação 15) e para-aórticos (estação 16), para além dos mais proximais.

O número mínimo de gânglios ressecados para um correcto estadiamento segundo a classificação TNM de 2009 [175-176] é de 15 gânglios.



Os vários parâmetros patológicos estão indicados nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2. Parâmetros patológicos do carcinoma gástrico

Dimensões do tumor
Forma macroscópica
Classificação histológica
Classificação da OMS
Classificação de Laurén
Classificação de Carneiro e colaboradores
Classificação de Ming
Invasão venosa
Permeação linfática
Invasão perineural
Citologia peritoneal

As dimensões do tumor foram avaliadas como variável contínua e na análise univariada como variável categorial. Após fixação em formol, os carcinomas foram classificados em dois grupos de acordo com o maior diâmetro: maior eixo inferior ou igual a 5 cm; maior eixo superior a 5 cm.

Foram consideradas as seguintes formas macroscópicas: vegetante, ulcerada, infiltrativa, ulcero-vegetante e ulcero-infiltrativa.

Segundo a classificação da OMS [434] os tumores foram classificados em tubulares (bem a moderadamente diferenciados ou pouco diferenciados), com células em anel de sinete, mucinosos, adenoescamosos, medular rico em estroma linfóide e mistos. De acordo com a classificação do carcinoma gástrico proposta por Laurén [14], os casos foram classificados em intestinais, difusos e inclassificáveis (ou mistos). Os carcinomas foram classificados em glandulares, de células isoladas, sólidos e mistos no que se refere à classificação proposta por Carneiro e colaboradores [212]. De acordo com a classificação definida por Ming [210], os carcinomas foram classificados em expansivos, em infiltrativos e em inclassificáveis.

A invasão venosa foi avaliada nas secções histológicas coradas pelo método histoquímico da orceína e definida como ausente ou presente. A permeação linfática e a invasão perineural foram avaliadas em lâminas coradas com Hematoxilina-Eosina (HE) e caracterizadas como ausente ou presente.

A citologia peritoneal foi realizada no início e no final da cirurgia, após a instilação de soro fisiológico no fundo de saco de Douglas e no espaço subfrénico esquerdo. Assim, foi classificada (após avaliação pelos métodos citológicos convencionais) como positiva quando mostrou a presença de células malignas, como negativa na sua ausência, como duvidosa quando não foi possível descartar a presença de células malignas e como inconclusiva quando o material foi insuficiente.



Tabela 3. Estadiamento do carcinoma gástrico

Tipo de carcinoma (EGC vs avançado)
Classificação TNM (7ª Edição)
Progressão na parede (T)
Metastização ganglionar (N)
Metastização à distância (M)
Estadio
Outros parâmetros
Rácio ganglionar
Classificação Japonesa (topográfica) da metastização ganglionar

Para o estadiamento dos tumores foi utilizada a classificação TNM de 2009 (7ª Edição da UICC/AJCC) [175-176].

Definiu-se EGC como aqueles tumores que não ultrapassam a submucosa (T0, T1a e 1b) e como tumores avançados os restantes (T2-4).

De acordo com a progressão do tumor na parede (T), os carcinomas foram classificados em: pT0 (tumores *in situ*), pT1a (carcinomas limitados à lâmina própria), pT1b (tumores da submucosa), pT2 (invasão da *muscularis propria*), pT3 (invasão da subserosa), pT4a (invasão da serosa) e pT4b (invasão de tecidos ou órgãos adjacentes).

O estado dos gânglios linfáticos foi classificado de acordo com a ausência ou com a presença de metástases. A metastização ganglionar (N) foi também classificada, de acordo com a 7ª Edição da Classificação TNM [175-176], nas seguintes classes: N0 (0 gânglios metastizados), N1 (1 a 2 gânglios com metástases), N2 (3 a 6 gânglios invadidos), N3a (7 a 15 gânglios metastizados) e N3b (mais de 15 gânglios invadidos). Foi avaliado o rácio entre os gânglios metastizados e os gânglios ressecados tendo sido dividido em dois grupos: menor ou igual a 0,2 e maior a 0,2. Segundo a classificação Japonesa, a metastização ganglionar foi avaliada segundo critérios topográficos [433]. Os gânglios linfáticos foram classificados em 3 grupo (níveis) dependendo da localização do tumor e a metastização ganglionar foi classificada nas seguintes classes: N0 (sem gânglios metastizados), N1 (metástases no nível 1 e ausência nos níveis 2 e 3), N2 (metástases no nível 2 e ausência no nível 3) e N3 (metástases no nível 3).

A metastização à distância foi classificada nas seguintes classes: M0 (sem metastização à distância) e M1 (com metastização à distância).

Os carcinomas foram estadiados de acordo com o sistema de estadiamento do TNM da UICC/AJCC [175-176]. Assim, os tumores foram classificados nos seguintes estadios, de acordo com a progressão na parede (T), com a metastização ganglionar (N) e a metastização à distância (M): **0** (Tis N0 M0), **IA** (T1 N0 M0), **IB** (T2 N0 M0; T1 N1 M0), **IIA** (T3 N0 M0; T2 N1 M0; T1 N2 M0), **IIB** (T4a N0 M0; T3 N1 M0; T2 N2 M0; T1 N3 M0), **IIIA** (T4a N1 M0; T3 N2 M0; T2 N3 M0), **IIIB** (T4b N0-1 M0; T4a N2 M0; T3 N3 M0), **IIIC** (T4b N2-3 M0; T4a N3 M0) e **IV** (T1-4 N1-3 M1).



Os parâmetros moleculares estudados estão indicados na Tabela 4.

Tabela 4. Parâmetros moleculares do carcinoma gástrico

p53
HER2/Neu (c-erb B2)
MUC1
MUC1 infraglicosilado
MUC5AC

O estudo dos parâmetros moleculares é relativo um intervalo de tempo mais restrito do que o período global do estudo.

Relativamente à expressão do c-erb B2, foi avaliada em 159 doentes entre Janeiro de 1988 e Dezembro de 1995, através da metodologia (imunohistoquímica com anticorpo policlonal) [248], sendo classificada em 2 grupos: negativo ou positivo (de acordo com a expressão do c-erb B2 na membrana celular).

A expressão de p53 nos tumores foi pesquisada em 157 doentes durante o mesmo período (1988-1995), através da metodologia descrita previamente (imunohistoquímica com anticorpo monoclonal) [435]. Os casos foram classificados em dois grupos: negativo (ausência ou menos de 5% das células com expressão) e positivo (presença em mais de 5% das células).

A expressão das mucinas (MUC1, MUC1 infraglicosilado e MUC5AC) foi pesquisada em 85 doentes entre Janeiro de 1988 e Dezembro de 1996, através da metodologia previamente descrita [313, 436] (imunohistoquímica com anticorpos monoclonais HMFG1 para a MUC1 [437], SM3 para a MUC1 infraglicosilada [438] e CLH2 para a MUC5AC [313]), sendo classificada em 2 grupos: negativo (ausência ou menos de 5% das células com expressão) e positivo (presença em mais de 5% das células).

Os valores relativos à sobrevida dos doentes foram obtidos a partir do Registo Oncológico do Hospital de São João EPE e dos Registos da Unidade de Patologia Esófago-Gástrica do Serviço de Cirurgia Geral do Hospital São João EPE. Foi possível obter informação correcta acerca do *follow-up* de 91,6% da globalidade dos doentes e de 98% dos doentes submetidos a cirurgia de ressecção. A sobrevida cumulativa dos doentes operados foi avaliada para cada um dos parâmetros em análise.

Na análise estatística dos resultados foi utilizado o programa de computador SPSS 16.0 para Windows. Os resultados são expressos em média, mediana, desvio padrão e proporções. As médias foram comparadas pelo teste t de *Student*. A variância foi comparada pelo método Anova. As proporções foram comparadas pelo teste do qui-quadrado ou pelo teste exacto de Fisher, sempre que aplicável. As curvas de sobrevida cumulativa foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier [439] e as diferenças pesquisadas pelo teste de log rank. A identificação dos factores de prognóstico foi pesquisada pelo modelo de Cox [440]. Dos parâmetros com influência significativa na sobrevida em análise univariada, foi escolhido para entrar no modelo o melhor grupo de parâmetros, que pudesse explicar o prognóstico dos tumores. O melhor grupo compreendia a idade, o sexo, a localização, o tipo de linfadenectomia segundo a classificação Japonesa, o tipo de ressecção, as dimensões do tumor, a classificação de Laurén,



a classificação de Ming, o pT (progressão do tumor na parede), o pN (metastização ganglionar), o rácio ganglionar, a classificação Japonesa da metastização ganglionar, o estadio (pTNM), a invasão venosa, a permeação linfática e invasão perineural. Não foram incluídos como covariantes na regressão de Cox parâmetros de interpretação subjectiva (classificações da OMS, de Laurén, de Ming e de Carneiro e colaboradores), parâmetros de interpretação difícil (forma macroscópica) ou parâmetros com um número relativamente elevado de *missings* (a expressão de p53, a expressão do HER2/neu, a citologia peritoneal).

Foram considerados significativos os valores de p inferiores a 0,05.

No sentido de avaliar a evolução ao longo do tempo do perfil clínico-patológico e molecular dos carcinomas gástrico, procedeu-se na nesta fase do estudo, à divisão da série global em três períodos de 7 anos (1º Período: Janeiro de 1988 a Dezembro de 1994; 2º Período: Janeiro de 1995 a Dezembro de 2001; 3º Período: Janeiro de 2002 a Dezembro de 2008).

As características clínico-patológicas previamente descritas foram avaliadas nos diferentes períodos assim como a sobrevida cumulativa dos doentes operados para cada um dos parâmetros em análise.

Como o intuito de avaliar algumas subpopulações específicas e procurar diferenças entre elas, nomeadamente os EGC, os EOGC, os carcinomas do tipo intestinal e do tipo difuso, os tumores proximais e os distais, as características clínico-patológicas anteriormente descritas foram avaliadas de acordo com o tipo de carcinoma, a idade do doente, a classificação de Laurén e a localização tumoral.

Alterações da O-glicosilação das proteínas: Biomarcadores para diagnóstico precoce de carcinoma gástrico

Nesta segunda parte da nossa investigação, foram estudadas as alterações da O-glicosilação das proteínas (das mucinas e do tipo Lewis) na procura de biomarcadores que permitam o diagnóstico precoce do carcinoma gástrico.

No Serviço de Cirurgia Geral do Hospital São João EPE, 50 doentes com carcinoma do estômago ou da JEG foram submetidos a cirurgia entre Janeiro de 2009 e Outubro de 2009.

Todos os doentes apresentavam adenocarcinoma documentado em biópsia, no caso dos carcinomas irresssecáveis, ou em peça de ressecção cirúrgica, no caso dos carcinomas ressecáveis. Todos os casos de carcinoma foram analisados e revistos no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital São EPE.

A informação relativa aos doentes estudados está registada numa base de dados informatizada da Unidade de Patologia Esofago-Gástrica do Serviço de Cirurgia Geral.



Dos 50 doentes estudados, 38 casos foram submetidos a cirurgia de ressecção. Em 36 dos 38 carcinomas ressecados (2 casos com material escasso por serem tumores muito iniciais), foi retirada uma amostra representativa dos blocos de parafina para a realização do estudo imunohistoquímico no tecido tumoral dos antígenos de carboidratos simples das mucinas (Tn, STn, T e ST) e dos antígenos de carboidratos do tipo Lewis (SLe^a e SLe^x).

Este estudo imunohistoquímico dos antígenos de carboidratos simples das mucinas e dos antígenos de carboidratos do tipo Lewis foi realizado no Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto (IPATIMUP).

O estudo imunohistoquímico foi realizado pelo método da avidina-biotina peroxidase de acordo com o descrito [436], com pequenas modificações, utilizando um Kit comercial (Vectastain Elite ABC Kit da Vector Laboratories). Testaram-se os anticorpos monoclonais para carboidratos de mucinas simples T, Tn e STn e para carboidratos do tipo Lewis SLe^a e SLe^x diluídos em 5% de albumina de soro bovino (BSA, Sigma Aldrich Co., USA) em solução tampão salina de fosfato com 0,001% tween 20 (PBS-T 0,01%). A caracterização dos antígenos estudados está resumida na Tabela 5. A imunorreatividade para ST foi evidenciada após tratamento com neuraminidase (Sigma Aldrich Co., USA) na concentração de 0,1 unidade/ml em tampão citrato (pH 5,5), com incubação em estufa a 37°C por duas horas. Para o bloqueio da actividade de peroxidase endógena, os cortes foram incubados em peróxido de hidrogénio (H₂O₂) a 0,5% em metanol, por 30 minutos. O bloqueio das ligações inespecíficas foi feito em câmara húmida por 20 minutos a temperatura ambiente com soro normal de coelho na diluição de 1:5 com 10% de BSA em PBS-T 0,01%. A incubação com os anticorpos primários efectuou-se em câmara húmida a 4°C *overnight*. Os cortes foram incubados com o anticorpo secundário policlonal coelho anti-ratinho imunoglobulinas (Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA) por 30 minutos na diluição de 1:200 à temperatura ambiente, seguindo-se incubação com o complexo avidina-biotina (Vectastain Elite ABC Kit da Vector Laboratories) por 30 minutos a temperatura ambiente. As reacções foram reveladas com 3-3'-diaminobenzidina (DAB em pastilhas, Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA) dissolvido em água com 0,02% de H₂O₂ por 7 minutos. Lavagens intermediárias foram feitas com PBS-T 0,01% (3 x 5 minutos cada). A coloração de fundo foi realizada com hematoxilina Mayer previamente filtrada. Como controlos positivos utilizaram-se amostras de mucosa gástrica previamente testadas para Tn, T, ST, SLe^a e SLe^x e amostras de MI e de mucosa intestinal não-metaplásica para STn.

Tabela 5. Antígenos estudados e anticorpos monoclonais específicos

Antígeno	Anticorpo*	Diluição
T	3C9	1:50
ST	3C9 após neuraminidase	1:50
Tn	1E3	1:10
STn	TKH2 e B72.3	1:20 e diluição de hibridoma
SLe ^a	CA19.9 (Santa Cruz Biotechnology)	1:500
SLe ^x	KM93 (Calbiochem)	1:100

*Hibridomas cedidos pelo Doutor Henrik Clausen



Os casos foram classificados qualitativamente de acordo com a imunorreactividade. Foram considerados negativos os casos que apresentavam nenhuma marcação ou marcação em menos de 5% de células; e positivos aqueles que apresentavam mais de 5% de imunorreactividade. Os casos positivos foram subdivididos em 4 grupos – <25%, 25 a 50%, 50 a 75% e >75% – de acordo com a percentagem de células tumorais imunorreactivas .

Na análise comparativa em os diferentes padrões de expressão (presença ou ausência, menos de 50% ou mais de 50%, os intervalos supra-citados da percentagem de expressão) dos antígenos de carboidratos simples das mucinas e do tipo Lewis e o perfil clínico-patológico do carcinoma gástrico, foram avaliados os parâmetros que são apresentados nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 6. Parâmetros clínico-patológicos do carcinoma gástrico

Idade
Sexo
Localização Tumoral
Dimensões do tumor
Forma macroscópica
Classificação histológica
Classificação da OMS
Classificação de Laurén
Classificação de Carneiro e colaboradores
Classificação de Ming
Invasão venosa
Permeação linfática
Invasão perineural

Tabela 7. Estadiamento do carcinoma gástrico

Tipo de carcinoma (EGC vs avançado)
Classificação TNM (7ª Edição)
Progressão na parede (T)
Metastização ganglionar (N)
Estadio
Outros parâmetros
Invasão da serosa
Rácio ganglionar

Na análise estatística dos resultados foi utilizado o programa de computador SPSS 16.0 para Windows. As médias foram comparadas pelos testes não-paramétricos de Mann-Whitney e de Kruskal-Wallis. A variância foi comparada pelo método Anova. As diferenças na distribuição foram comparadas pelo teste do qui-quadrado ou pelo teste exacto de Fisher, sempre que aplicável.

Foram considerados significativos os valores de p inferiores a 0,05.



RESULTADOS

Caracterização clínico-patológica e prognóstica do carcinoma gástrico: A evolução da nossa realidade

Na primeira fase do estudo, procedeu-se à caracterização clínica, patológica, molecular e do estadiamento assim como à análise das curvas de sobrevida cumulativa dos 1272 doentes com carcinoma do estômago ou da JEG da nossa série.

Caracterização clínica

Na Tabela 8 estão indicadas as principais características clínicas dos doentes com carcinoma gástrico e da JEG da série global.

A idade média e o desvio de padrão eram de $64,4 \pm 13,45$ anos. Neste período, 133 (10,59%) doentes tinham idade inferior a 45 anos no momento do diagnóstico, ou seja, apresentavam EOGC e 1123 (89,41%) doentes tinham mais de 45 anos.

Na distribuição pelos sexos, 812 (63,84%) eram do sexo masculino e 460 (36,16%) do sexo feminino, apresentando uma relação sexo feminino/masculino de 1 : 1,8.

A maioria dos tumores (489 casos) localizavam-se no antro gástrico (51,1%), 236 casos (24,66%) eram tumores do corpo ou do fundo gástricos e 232 (24,24%) eram carcinomas da JEG.

Nesta série, a cirurgia de ressecção foi possível em 841 casos (66,12%), enquanto em 431 doentes (33,88%) os tumores não foram ressecados. A taxa de inoperabilidade foi de 14,8% (188 casos) e 243 doentes (19,1%) foram submetidos a cirurgia de não ressecção.

Nos tumores da JEG, a cirurgia de ressecção realizada foi a operação de Lortat-Jacob em 70,47% dos casos, esofagogastrectomia por via trans-hiatal em 12,08% dos doentes, a operação de Sweet em 10,74% e a operação de Ivor-Lewis em 10 (6,71%) doentes. Nos tumores do estômago foram realizadas 330 (49,85%) gastrectomia subtotais distais e 306 (46,22%) gastrectomias totais. Nos casos dos tumores do coto gástrico foram realizadas 26 (3,93%) degastrogastrectomias.

Em relação ao tipo de ressecção, foi realizada uma ressecção do tipo R0 na maioria dos casos (79,96%), tendo sido do tipo R1 e R2 em 11,84% e 8,2% dos casos, respectivamente.

A linfadenectomia realizada nas cirurgias de ressecção, segundo a classificação de Siewert, foi D1 (≤ 25 gânglios ressecados) na maioria dos doentes (66,52%) e D2 (> 25 gânglios ressecados) em 33,48% dos casos. Relativamente à classificação Japonesa (topográfica) da linfadenectomia, em 53,87% dos casos foi D2, em 43,82% dos doentes foi D1 e em apenas 14 casos (2,31%) foi D0. Em média foram ressecados $22,53 \pm 13,03$ gânglios na cirurgia de ressecção e em 67,8% dos casos foram ressecados mais de 15 gânglios.



Tabela 8. Caracterização clínica da série global (1988 a 2008)

Parâmetros	Série Global (1988-2008)	
	n	(%)
Idade (n=1256)		
≤ 45 anos	133	(10,59%)
> 45 anos	1123	(89,41%)
Sexo (n=1272)		
Masculino	812	(63,84%)
Feminino	460	(36,16%)
Localização (n=957)		
JEG	232	(24,24%)
Fundo/Corpo	236	(24,66%)
Antro	489	(51,10%)
Ressecabilidade Global (n=1272)		
Ressecável	841	(66,12%)
Irressecável	431	(33,88%)
Tipo de Cirurgia		
JEG (n=177)		
Não ressecção	28	(15,82%)
Ressecção	149	(84,18%)
<i>Op. Lortat-Jacob</i>	105	(70,47%)
<i>Op. Sweet</i>	16	(10,74%)
<i>Op. Ivor-Lewis</i>	10	(6,71%)
<i>Esofagogastrectomia Trans-hiatal</i>	18	(12,08%)
Estômago (n=839)		
Não ressecção	177	(21,1%)
Ressecção	662	(78,9%)
<i>Gastrectomia Total</i>	306	(46,22%)
<i>Gastrectomia Subtotal Distal</i>	330	(49,85%)
<i>Degastrogastrectomia</i>	26	(3,93%)
Tipo de Ressecção (n=549)		
R0	439	(79,96%)
R1	65	(11,84%)
R2	45	(8,20%)
Linfadenectomia		
Siewert (n=705)		
D1 (≤25)	469	(66,52%)
D2 (>25)	236	(33,48%)
Japonesa (n=607)		
D0	14	(2,31%)
D1	266	(43,82%)
D2	327	(53,87%)
Número de gânglios estudados (n=705)		
≤15	227	(32,20%)
>15	478	(67,80%)



Caracterização patológica e molecular

Na Tabela 9 são apresentadas as principais características patológicas e moleculares dos carcinomas gástricos e da JEG da série global que foram ressecados.

A média e o desvio de padrão da dimensão do tumor foram $5,86 \pm 3,7$ cm, sendo que metade (49,86%) dos tumores apresentava um tamanho superior a 5 cm.

Em relação à forma macroscópica, 209 carcinomas (30,42%) foram classificados como ulcero-infiltrativos, 198 carcinomas (28,82%) como ulcerados, 154 casos (22,42%) como ulcero-vegetantes, 65 casos (9,46%) como vegetantes e 61 (8,88%) como infiltrativos.

Segundo a classificação da OMS, a maioria (57,61%) dos tumores (409 casos) eram do tipo tubular, dos quais 360 eram bem a moderadamente diferenciados e 49 pouco diferenciados. Em 214 casos (30,14%), os carcinomas eram de células isoladas em anel de sinete, 48 (6,76%) eram carcinomas mistos, 30 (4,23%) eram carcinomas mucinosos, 7 (0,99%) eram tumores adenoescamosos e em 2 casos (0,28%) eram do tipo medular rico em estroma linfóide.

Na série global, 49,22% dos carcinomas eram do tipo intestinal, 23,97% eram do tipo difuso e 26,82% não eram classificáveis de acordo com a classificação proposta por Laurén.

A classificação histológica dos carcinomas do estômago proposta por Carneiro e colaboradores foi avaliada em 517 casos, sendo que 37,91% dos doentes apresentavam carcinomas glandulares, 35,98% apresentavam carcinomas mistos, 18,76% apresentam carcinomas de células isoladas e 7,35% carcinomas sólidos.

Em 70,44% dos doentes, os carcinomas apresentavam um crescimento infiltrativo de acordo com a classificação de Ming, enquanto 26,32% dos carcinomas apresentavam um crescimento expansivo e 22 casos (3,24%) não eram classificáveis.

A invasão venosa estava presente em mais de metade dos doentes (56,96%) assim como a invasão perineural (54,05%). Por outro lado, a permeação linfática encontrava-se presente numa percentagem muito elevada dos doentes (81,20%). Nos tumores sem metastização ganglionar (N0), a permeação linfática estava presente em cerca de metade (46,2%) dos casos.

Relativamente aos factores moleculares, a expressão de p53 foi avaliada em 157 casos e a expressão de HER2/neu (c-erb B2) em 159, sendo positiva em 28,03% e 15,09% dos carcinomas, respectivamente.

Foi realizada citologia durante a cirurgia em 446 casos, mas apenas em 52 casos (11,66%) foi positiva.



Tabela 9. Caracterização patológica e molecular dos tumores ressecados da série global

Parâmetros	Série Global (1988-2008)	
	n	(%)
Dimensões (n=692)		
≤ 5 cm	347	(50,14%)
> 5 cm	345	(49,86%)
Forma macroscópica (n=687)		
Vegetante	65	(9,46%)
Ulcerada	198	(28,82%)
Infiltrativa	61	(8,88%)
Ulceró-vegetante	154	(22,42%)
Ulceró-infiltrativa	209	(30,42%)
Classificação da OMS (n=710)		
Tubular	409	(57,61%)
<i>Bem-moderadamente diferenciado</i>	360	(50,70%)
<i>Pouco diferenciado</i>	49	(6,90%)
Células isoladas em anel de sinete	214	(30,14%)
Mucinosos	30	(4,23%)
Adenoescamosos	7	(0,99%)
Medular rico em estroma linfóide	2	(0,28%)
Mistos	48	(6,76%)
Classificação de Laurén (n=701)		
Intestinal	345	(49,22%)
Difuso	168	(23,97%)
Não classificável	188	(26,82%)
Classificação de Carneiro e colaboradores (n=517)		
Glandular	196	(37,91%)
Misto	186	(35,98%)
Células isoladas	97	(18,76%)
Sólidos	38	(7,35%)
Classificação de Ming (n=680)		
Expansivo	179	(26,32%)
Infiltrativo	479	(70,44%)
Não classificável	22	(3,24%)
Invasão Venosa (n=718)		
Presente	409	(56,96%)
Ausente	309	(43,04%)
Permeação Linfática (n=718)		
Presente	583	(81,20%)
Ausente	135	(18,80%)
Invasão Perineural (n=481)		
Presente	260	(54,05%)
Ausente	221	(45,95%)
Factores moleculares		
p53 (n=157)		
Positivo	44	(28,03%)
Negativo	113	(71,97%)
HER2/neu (c-erb B2) (n=159)		
Positivo	24	(15,09%)
Negativo	135	(84,91%)
Citologia (n=446)		
Positiva	52	(11,66%)
Negativa	379	(84,98%)
Duvidosa	9	(2,02%)
Inconclusiva	6	(1,35%)



Estadiamento

O estadiamento dos tumores submetidos a cirurgia de ressecção está resumido na Tabela 10.

A percentagem de EGC na série global foi de 12,68%. A progressão de carcinoma na parede (T), segundo a classificação TNM de 2009 (7ª Edição da UICC/AJCC), apresentava a seguinte distribuição: T0 (*in situ*) em 5 casos (0,67%), T1a (lâmina própria) em 59 (7,88%), T1b (submucosa) em 74 (9,88%), T2 (*muscularis propria*) em 66 (8,81%), T3 (subserosa) em 259 (34,58%), T4a (serosa) em 238 (31,78%) e T4b (órgãos adjacentes) em 48 doentes (6,41%).

A metastização ganglionar estava presente em 66,58% dos casos, com uma média de $5,83 \pm 8,28$ e uma mediana de 2 gânglios metastizados (entre 0 e 54 gânglios) na altura da cirurgia de ressecção. Segundo a classificação TNM de 2009, 263 carcinomas (34,56%) eram N0, 135 (17,74%) eram N1 (1 a 2 gânglios metastizados), 121 (15,9%) eram N2 (3 a 6 gânglios metastizados), 154 (20,24%) eram N3a (7 a 15 gânglios metastizados) e 88 (11,56%) eram N3b (> 15 gânglios metastizados). A avaliação da metastização ganglionar segundo o rácio entre os gânglios metastizados e os gânglios estudados foi realizada em 715 doentes, com um rácio médio de $0,25 \pm 0,3$, dos quais 298 (41,68%) apresentavam um rácio superior a 0,2. Em relação à metastização ganglionar, foi avaliada a classificação Japonesa (topográfica) em 744 casos, 35,35% eram N0, 41,67% N1, 21,37% eram N2 e 1,61% eram N3.

A distribuição dos casos de acordo com o estadio da 7ª edição da classificação TNM era a seguinte: estadio 0 em 0,67% dos doentes, IA em 15,09%, IB em 8,68%, IIA em 10,28%, IIB em 10,41%, IIIA em 12,42%, IIIB em 17,09%, IIIC em 15,89% e IV em 9,48%.



Tabela 10. Estadiamento dos tumores ressecados da série global (1988-2008)

Parâmetros	Série Global (1988-2008)	
	n	(%)
Tipo de Carcinoma (n=1222)		
Early Gastric Cancer	155	(12,68%)
Avançado	1067	(87,32%)
Classificação TNM		
Progressão na parede (T)		
<i>TNM 7ª Edição (2009) (n=749)</i>		
T0 - <i>in situ</i>	5	(0,67%)
T1a - lâmina própria	59	(7,88%)
T1b - submucosa	74	(9,88%)
T2 - <i>muscularis propria</i>	66	(8,81%)
T3 - subserosa	259	(34,58%)
T4a - perfura a serosa	238	(31,78%)
T4b - órgãos adjacentes	48	(6,41%)
Metastização ganglionar (N) (n=787)		
Presente	524	(66,58%)
Ausente	263	(33,42%)
<i>TNM 7ª Edição (2009) (n=761)</i>		
N0 (0)	263	(34,56%)
N1 (1-2)	135	(17,74%)
N2 (3-6)	121	(15,90%)
N3a (7-15)	154	(20,24%)
N3b (>15)	88	(11,56%)
<i>Rácio (metastizados/ressecados) (n=715)</i>		
≤ 0,2	417	(58,32%)
> 0,2	298	(41,68%)
<i>Classificação japonesa (topográfica) (n=744)</i>		
N0	263	(35,35%)
N1	310	(41,67%)
N2	159	(21,37%)
N3	12	(1,61%)
Metastização à distância (M) (n=791)		
M0	720	(91,02%)
M1	71	(8,98%)
Estadio		
<i>TNM 7ª Edição (2009) (n=749)</i>		
0	5	(0,67%)
IA	113	(15,09%)
IB	65	(8,68%)
IIA	77	(10,28%)
IIB	78	(10,41%)
IIIA	93	(12,42%)
IIIB	128	(17,09%)
IIIC	119	(15,89%)
IV	71	(9,48%)



Análise da sobrevida

A sobrevida aos 5 anos da série global foi de 33,7%, com uma sobrevivência média de 89,2 meses e uma mediana de 21 meses.

A análise univariada da sobrevida de acordo com os parâmetros clínicos, patológicos, moleculares e estadiamento é apresentada nas Tabelas 11 a 14.

Os parâmetros clínicos com diferenças significativas na sobrevida cumulativa foram os seguintes (*valores de p relativos à comparação das curvas de sobrevida pelo teste log-rank*): idade ($p<0,001$), localização ($p=0,03$), ressecabilidade ($p<0,001$), tipo de ressecção ($p<0,001$) e a linfadenectomia segundo a classificação Japonesa ($p<0,001$).

Tabela 11. Análise univariada da sobrevida da série global, de acordo com os parâmetros clínicos

Parâmetros	Sobrevida			Valor de p log-rank
	Média (meses)	Mediana (meses)	% aos 5 anos	
Global	89,2	21	33,7	
Idade				<0,001 ($p<0,05$)
≤ 45 anos	75,92	32	44	
> 45 anos	83,1	20	31	
Sexo				0,694 ($p=ns$)
Masculino	64,5	20	33	
Feminino	86,7	23	34	
Localização				0,03 ($p<0,05$)
JEG	67,9	25	39	
Fundo/Corpo	60,7	20	39	
Antro	105,9	36	46	
Ressecabilidade				<0,001 ($p<0,05$)
Ressecável	112,3	38	41	
Irressecável	9,1	3	20	
Cirurgia Ressecção Gástrica				0,19 ($p=ns$)
Gastrectomia Total	83,1	45	42	
Gastrectomia Subtotal Distal	101,9	38	39	
Degastrogastrectomia	52,8	38	27	
Tipo de Ressecção ("R")				<0,001 ($p<0,05$)
R0	100,3	126	57	
R1	23,2	17	26	
R2	14,2	7	15	
Linfadenectomia				
Siewert				0,09 ($p=ns$)
D1 (≤25)	99,3	35	36	
D2 (>25)	90,7	74	45	
Japonesa				<0,001 ($p<0,05$)
D0	44,9	20	31	
D1	90,8	30	31	
D2	92,1	74	46	



Os doentes com EOGC (≤ 45 anos) apresentaram sobrevidas superiores (44% aos 5 anos) às dos indivíduos com mais de 45 anos (31%) [Figura 8].

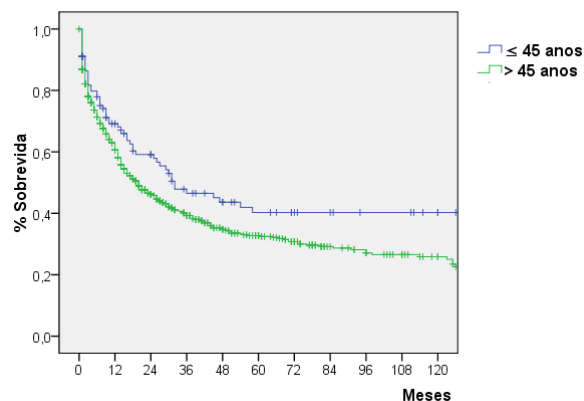


Figura 8. Sobrevida da série global, de acordo com o grupo etário

Relativamente à localização tumoral, os tumores da JEG e do corpo e fundo apresentaram sobrevidas inferiores (39% aos 5 anos) em comparação com os tumores do antro (46%) [Figura 9].

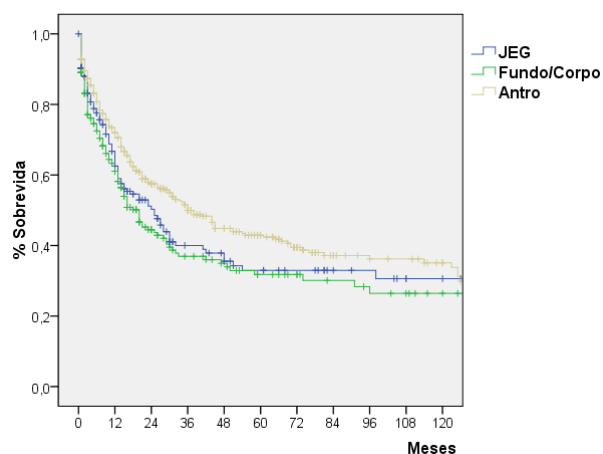


Figura 9. Sobrevida da série global, de acordo com a localização tumoral

Os doentes com tumores ressecáveis apresentaram curvas de sobrevida cumulativa superiores (41% aos 5 anos) às dos tumores irressecáveis (20%) [Figura 10].

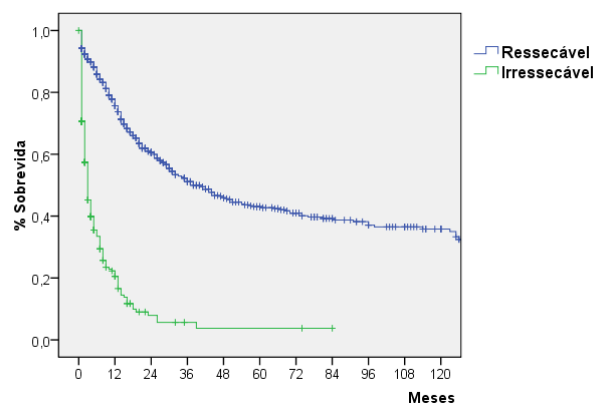


Figura 10. Sobrevida da série global, de acordo com a ressecabilidade



Os doentes submetidos a linfadenectomias mais alargadas (D2 segundo a classificação Japonesa) apresentaram sobrevidas superiores (46% aos 5 anos) em comparação com as linfadenectomias menos alargadas do tipo D0 e D1 (31% em ambas) [Figura 11].

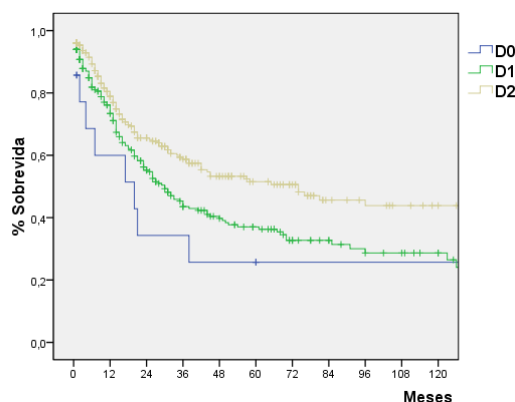


Figura 11. Sobrevida da série global, de acordo com o tipo de linfadenectomia segundo a classificação Japonesa

As ressecções do tipo R0 associaram-se a sobrevidas superiores (57% aos 5 anos) comparativamente às das ressecções R1 e R2 (26% e 15%, respectivamente) [Figura 12].

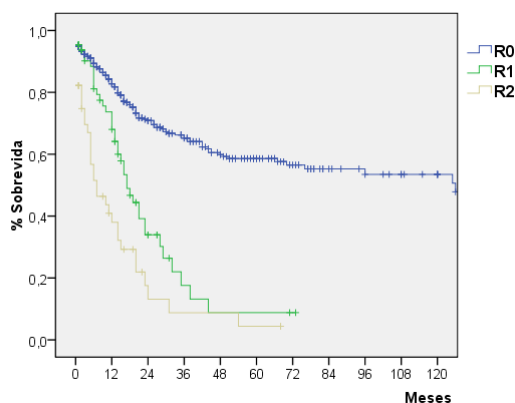


Figura 12. Sobrevida da série global, de acordo com o tipo de ressecção

Os parâmetros patológicos com diferenças significativas na sobrevida cumulativa dos doentes foram os seguintes (*valores de p relativos à comparação das curvas de sobrevida pelo teste log-rank*): dimensões do tumor ($p < 0,001$), forma macroscópica ($p = 0,027$), classificação da OMS ($p = 0,015$), classificação de Laurén ($p < 0,001$), classificação de Carneiro e colaboradores ($p = 0,017$), classificação de Ming ($p < 0,001$), invasão venosa ($p < 0,001$), permeação linfática ($p < 0,001$), invasão perineural ($p < 0,001$) e citologia ($p < 0,001$).



Tabela 12. Análise univariada da sobrevida da série global, de acordo com os parâmetros patológicos

Parâmetros	Sobrevida			Valor de p
	Média (meses)	Mediana (meses)	% aos 5 anos	log-rank
Global	89,2	21	33,7	
Dimensões				<0,001 (p<0,05)
≤ 5 cm	98,9	96	50	
> 5 cm	80,7	25	26	
Forma macroscópica				0,027 (p<0,05)
Vegetante	78,1	49	43	
Ulcerada	93,7	96	50	
Infiltrativa	18,3	12	-	
Ulcerovogetante	106,6	36	44	
Ulcerovo-infiltrativa	67,8	33	30	
Classificação da OMS				0,015 (p<0,05)
Tubular				
<i>Bem-moderadamente diferenciado</i>	125,2	69	46	
<i>Pouco diferenciado</i>	48,8	17	18	
Células isoladas em anel de sinete	66,6	32	34	
Mucinosos	75,4	38	38	
Adenoescamosos	10,3	9	-	
Medular rico em estroma linfóide	20	20	-	
Mistos	36,6	26	52	
Classificação de Laurén				<0,001 (p<0,05)
Intestinal	125,7	69	46	
Difuso	70,9	35	37	
Não classificável	52	21	24	
Classificação de Carneiro e colaboradores				0,017 (p<0,05)
Glandular	127,1	65	48	
Misto	56,7	23	29	
Células isoladas	79,9	36	43	
Sólidos	52,9	21	21	
Classificação de Ming				<0,001 (p<0,05)
Expansivo	140,8	91	45	
Infiltrativo	63,5	27	34	
Não classificável	88,9	123	59	
Invasão Venosa				<0,001 (p<0,05)
Presente	49,6	21	23	
Ausente	164,9	126	56	
Permeação Linfática				<0,001 (p<0,05)
Presente	90,7	30	31	
Ausente	134,5	-	70	
Invasão Perineural				<0,001 (p<0,05)
Presente	41,2	24	25	
Ausente	88,3	-	56	
Citologia				<0,001 (p<0,05)
Positiva	14,1	11	-	
Negativa	67,9	55	40	
Duvidosa	19,1	10	18	
Inconclusiva	17	12	-	



Os doentes com tumores de menores dimensões (≤ 5 cm) apresentaram sobrevidas superiores (50% aos 5 anos) do que os tumores com mais de 5 cm (26%) [Figura 13].

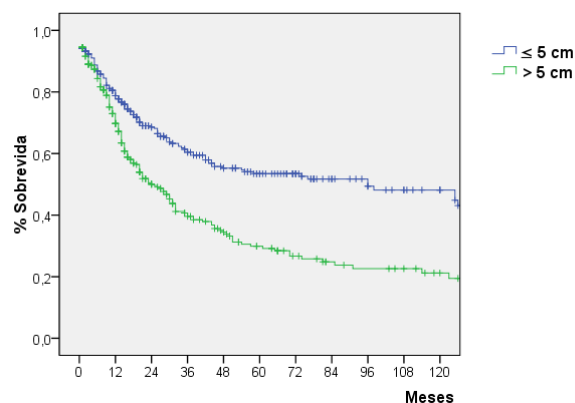


Figura 13. Sobrevida da série global, de acordo com as dimensões do tumor

Os carcinomas infiltrativos e ulcero-infiltrativos apresentaram sobrevidas inferiores (mediana 12 meses e 30% aos 5 anos, respectivamente) em comparação com as outras formas macroscópicas (entre 43 e 50% aos 5 anos) [Figura 14].

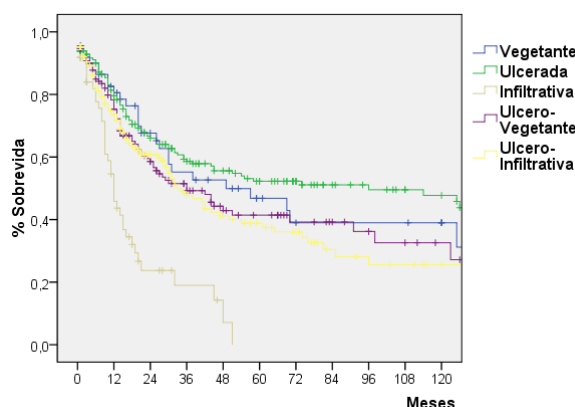


Figura 14. Sobrevida da série global, de acordo com a forma macroscópica

Os carcinomas tubulares pouco diferenciados, os tumores adenoescamosos e os do tipo medular rico em estroma linfóide apresentaram sobrevidas inferiores (18% aos 5 anos, medianas de 9 e 20 meses, respectivamente) em comparação com os outros subtipos da classificação da OMS (entre 34 e 52% aos 5 anos) [Figura 15].

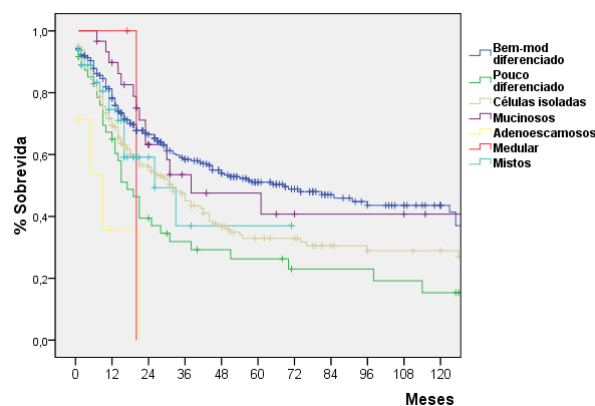


Figura 15. Sobrevida da série global, de acordo com a classificação da OMS



Os tumores do tipo intestinal apresentaram sobrevidas superiores (46% aos 5 anos) em comparação com os carcinomas do tipo difuso (37%) e os tumores não classificáveis segundo a classificação de Laurén (24%) [Figura 16].

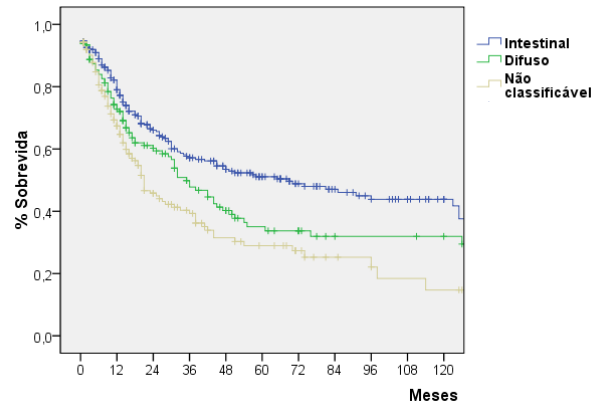


Figura 16. Sobrevida da série global, de acordo com a classificação de Laurén

De acordo com a classificação de Carneiro e colaboradores, os carcinomas glandulares e os carcinomas com células isoladas apresentaram sobrevidas superiores (48 e 43% aos 5 anos, respectivamente) comparativamente aos tumores mistos e aos tumores sólidos (29 e 21% aos 5 anos, respectivamente) [Figura 17].

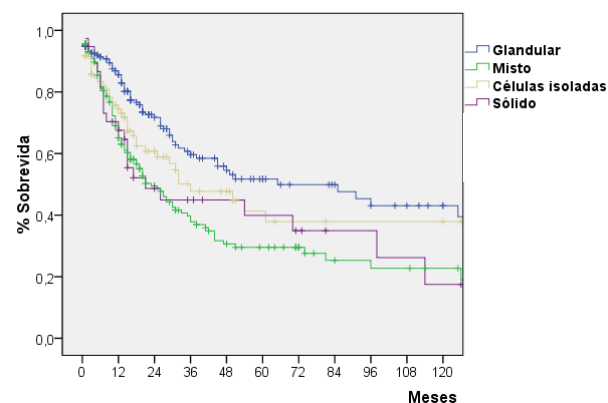


Figura 17. Sobrevida da série global, de acordo com a classificação de Carneiro e colaboradores

Os tumores infiltrativos condicionaram sobrevidas inferiores (34% aos 5 anos) em comparação com os outros subtipos (expansivo e não classificável) da classificação de Ming (45 e 59% aos 5 anos, respectivamente) [Figura 18].



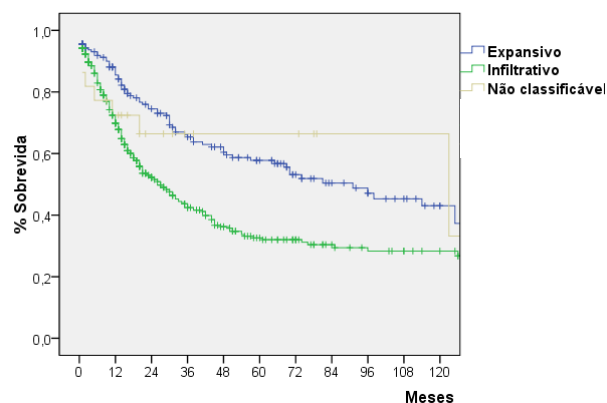


Figura 18. Sobrevida da série global, de acordo com a classificação de Ming

A presença de invasão venosa, de permeação linfática e de invasão perineural associaram-se a curvas de sobrevida cumulativa inferiores (23, 31 e 25% aos 5 anos, respectivamente) em comparação com os casos em que não se verificava a presença destes factores (56, 70 e 56% aos 5 anos, respectivamente). Nos tumores sem metastização ganglionar (N0), a presença de permeação linfática também se associou a sobrevidas inferiores (71% vs 47% aos 5 anos) [Figuras 19 a 22].

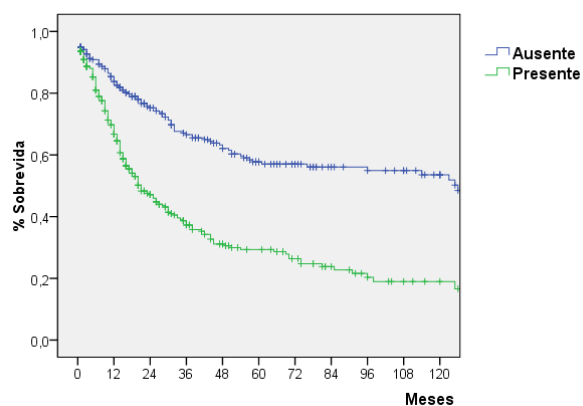


Figura 19. Sobrevida da série global, de acordo com a invasão venosa

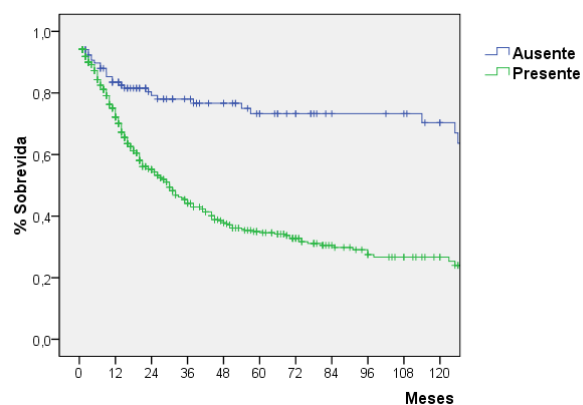


Figura 20. Sobrevida da série global, de acordo com a permeação linfática



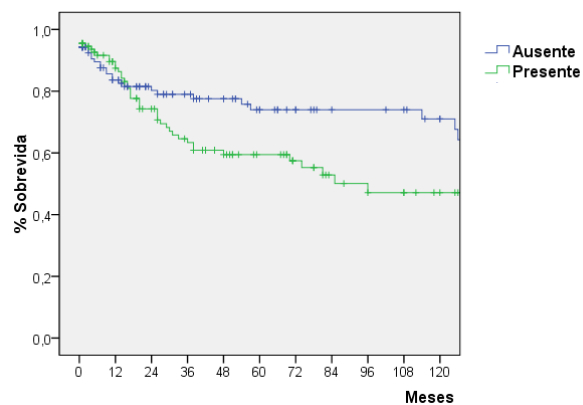


Figura 21. Sobrevida da série global, de acordo com a permeação linfática nos tumores N0

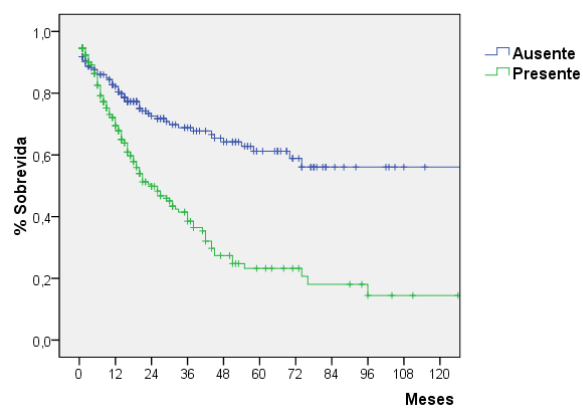


Figura 22. Sobrevida da série global, de acordo com a invasão perineural

A presença de uma citologia negativa associou-se a curvas de sobrevida cumulativa superiores (40% aos 5 anos e mediana de 55 meses) em comparação com os casos de citologia positiva (mediana de 11 meses) [Figura 23].

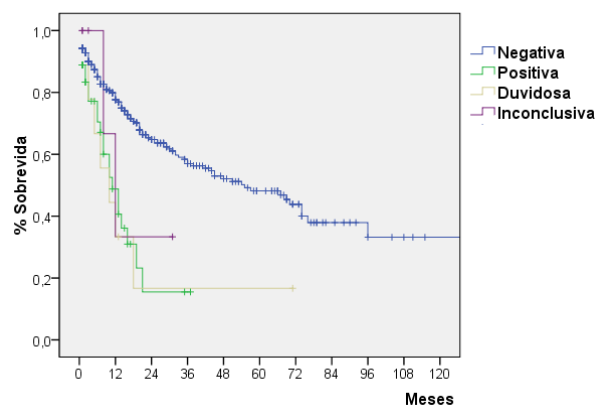


Figura 23. Sobrevida da série global, de acordo com a citologia



Os parâmetros moleculares associados a diferenças significativas nas curvas de sobrevida cumulativa foram os seguintes (*valores de p relativos à comparação das curvas de sobrevida pelo teste log-rank*): p53 ($p=0,006$) e HER2/neu (c-erb B2) ($p=0,005$).

Tabela 13. Análise univariada da sobrevida da série global, de acordo com os parâmetros moleculares

Parâmetros	Sobrevida			Valor de p log-rank
	Média (meses)	Mediana (meses)	% aos 5 anos	
Global	89,2	21	33,7	
p53				0,006 ($p<0,05$)
Positivo	40	15	15	
Negativo	118,7	35	38	
HER2/neu (c-erb B2)				0,005 ($p<0,05$)
Positivo	28,5	12	13	
Negativo	108	35	36	
MUC1				0,313 ($p=ns$)
Positivo	99,4	31	37	
Negativo	20,3	12	-	
MUC1 infraglicosilado				0,095 ($p=ns$)
Positivo	120,6	30	37	
Negativo	48	15	27	
MUC5AC				0,24 ($p=ns$)
Positivo	105,8	48	43	
Negativo	51	30	22	

Os doentes com expressão de p53 e de HER2/neu (c-erb B2) apresentaram sobrevidas inferiores (15 e 13% aos 5 anos, respectivamente) do que os doentes sem expressão destes marcadores moleculares (38 e 36% aos 5 anos) [Figura 24 e 25].

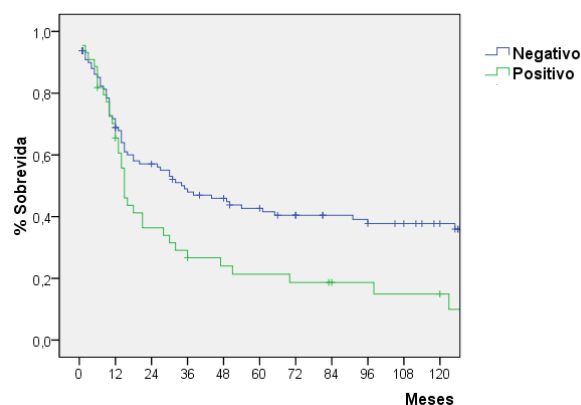


Figura 24. Sobrevida da série global, de acordo com a expressão de p53



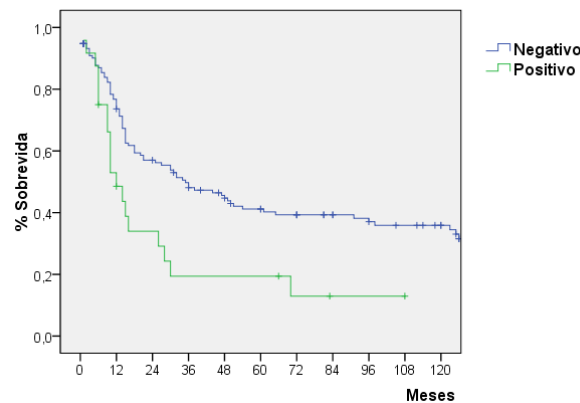


Figura 25. Sobrevida da série global, de acordo com a expressão de HER2/neu (c-erb B2)

Todos os parâmetros classicamente relacionados com o estadiamento apresentaram diferenças significativas nas curvas de sobrevida cumulativa (*valores de p relativos à comparação das curvas de sobrevida pelo teste log-rank*): tipo de carcinoma ($p<0,001$), progressão na parede (T) ($p<0,001$), metastização ganglionar (N) ($p<0,001$), metastização à distância (M) ($p<0,001$) e estadio ($p<0,001$).

Os doentes com EGC apresentaram sobrevidas aos 5 anos superiores (73%) em comparação com os doentes com tumores avançados (26%) [Figura 26].

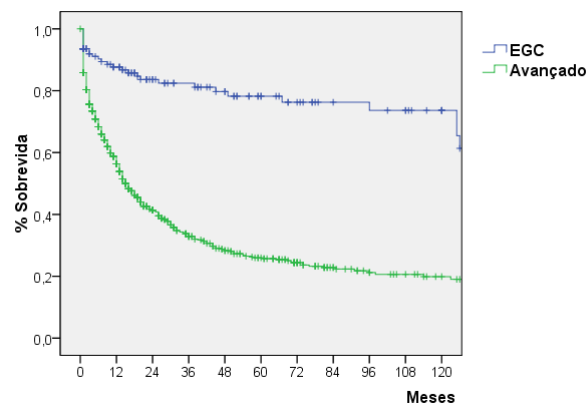


Figura 26. Sobrevida da série global, de acordo com o tipo de carcinoma (EGC vs avançado)

Em relação à progressão na parede (T da 7ª Edição da classificação TNM), verificou-se uma diminuição da sobrevida à medida que o carcinoma progredia na parede [Figura 27].

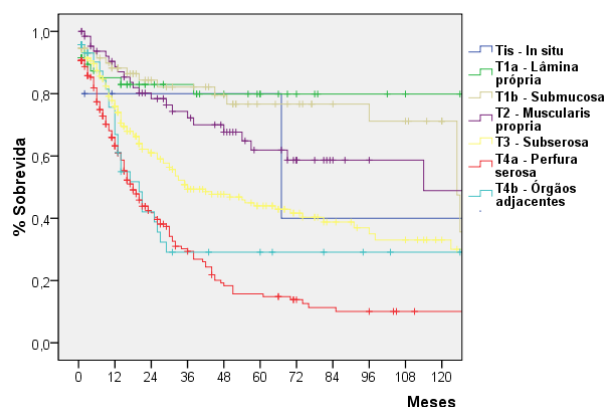


Figura 27. Sobrevida da série global, de acordo com a progressão na parede (T) segundo a classificação TNM de 2009 (7ª Edição da UICC/AJCC)



Os doentes com tumores sem metastização ganglionar apresentaram sobrevidas significativamente superiores (60% aos 5 anos) em comparação com os casos com metastização ganglionar (29%). Na classificação TNM e na classificação Japonesa observou-se uma diminuição da sobrevida à medida que aumentava o valor do N, com sobrevidas aos 5 anos entre 60% para os N0 e 0% para os N3b da classificação TNM e N3 da classificação Japonesa [Figuras 28 a 30].

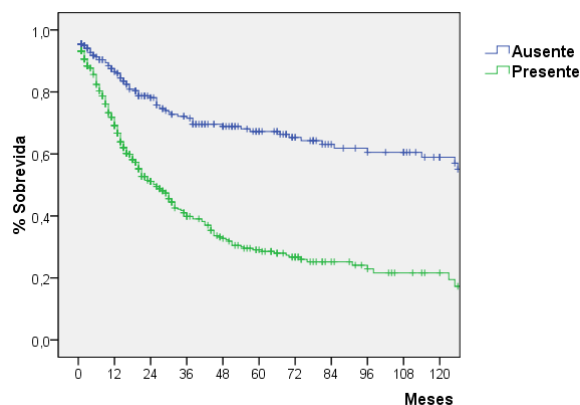


Figura 28. Sobrevida da série global, de acordo com a metastização ganglionar

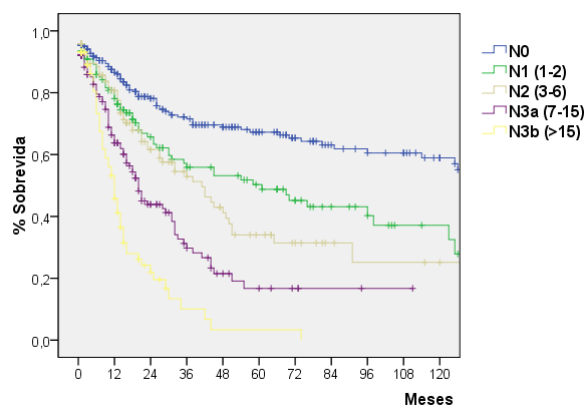


Figura 29. Sobrevida da série global, de acordo com a metastização ganglionar (N) segundo a classificação TNM de 2009 (7ª Edição da UICC/AJCC)

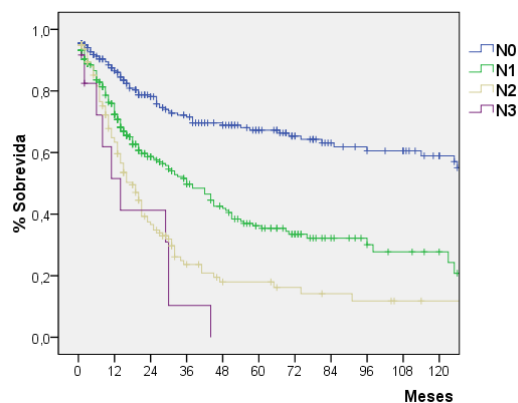


Figura 30. Sobrevida da série global, de acordo com a metastização ganglionar segundo a classificação Japonesa (topográfica)



Nos doentes com metastização ganglionar, o rácio entre os gânglios metastizados e os gânglios ressecados foi um bom estratificador em termos de sobrevida (53% aos 5 anos para valores $\leq 0,2$ vs 21% para valores $> 0,2$) [Figura 31].

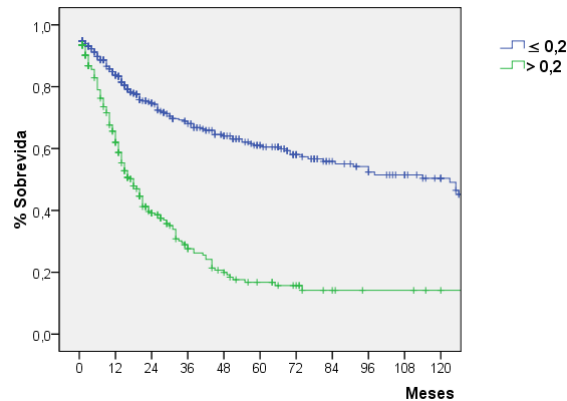


Figura 31. Sobrevida da série global, de acordo com o rácio entre os gânglios metastizados e os gânglios estudados

Os doentes sem metastização à distância na altura da cirurgia de ressecção apresentaram sobrevidas aos 5 anos (42%) significativamente superiores em comparação com os casos com metastização à distância (28%) [Figura 32].

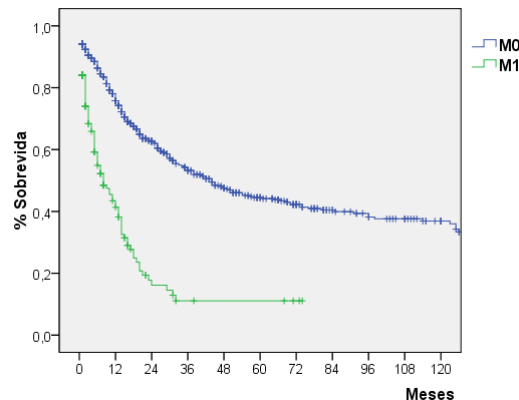


Figura 32. Sobrevida da série global, de acordo com a metastização à distância (M) segundo a classificação TNM de 2009 (7ª Edição da UICC/AJCC)

Em relação ao estadio (7ª Edição da classificação TNM), verificou-se uma diminuição da sobrevida à medida que o estadio avançava [Figura 33].

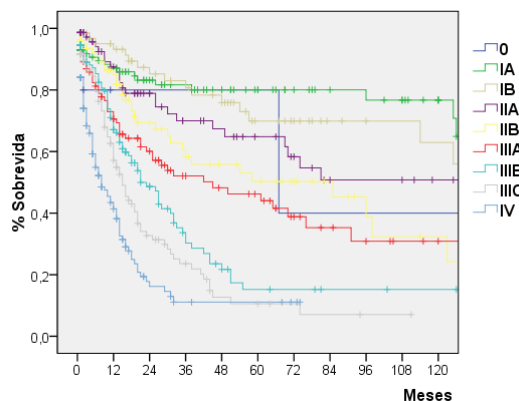


Figura 33. Sobrevida da série global, de acordo com o estadio segundo a classificação TNM de 2009 (7ª Edição da UICC/AJCC)



Tabela 14. Análise univariada da sobrevida da série global, de acordo com o estadiamento

Parâmetros	Sobrevida			log-rank
	Média (meses)	Mediana (meses)	% aos 5 anos	log-rank
Global	89,2	21	33,7	
Tipo de Carcinoma				<0,001 (p<0,05)
Early Gastric Cancer	127,8	-	73	
Avançado	71,3	15	26	
Classificação TNM				
Progressão na parede (T)				
TNM 7ª Edição (2009)				<0,001 (p<0,05)
T0 - <i>in situ</i>	93,4	67	38	
T1a - lâmina própria	132,9	-	78	
T1b - submucosa	109,8	125	71	
T2 - <i>muscularis propria</i>	109,9	114	53	
T3 - subserosa	113,5	36	37	
T4a - perfura a serosa	36,1	18	17	
T4b - órgãos adjacentes	54,2	20	28	
Metastização ganglionar (N)				<0,001 (p<0,05)
Presente	121,1	-	60	
Ausente	72	26	29	
TNM 7ª Edição (2009)				<0,001 (p<0,05)
N0 (0)	121,1	-	60	
N1 (1-2)	105,9	61	40	
N2 (3-6)	67,4	41	34	
N3a (7-15)	34,9	20	31	
N3b (>15)	16,4	12	0	
Rácio (metastizados/ressecados)				<0,001 (p<0,05)
≤ 0,2	107	123	53	
> 0,2	59,1	18	21	
Classificação japonesa (topográfica)				<0,001 (p<0,05)
N0	121,1	-	60	
N1	91,2	36	34	
N2	35,9	18	16	
N3	18	14	-	
Metastização à distância (M)				<0,001 (p<0,05)
M0	118,2	45	42	
M1	22,1	14	28	
Estadio				
TNM 7ª Edição (2009)				<0,001 (p<0,05)
0	93,4	67	38	
IA	126,6	-	75	
IB	123,5	137	67	
IIA	108,3	-	51	
IIB	110,3	85	42	
IIIA	74,4	45	30	
IIIB	41,2	21	30	
IIIC	25,9	15	16	
IV	15,6	8	27	



A análise multivariada pelo método da regressão de Cox (*Stepwise*) identificou como factores de prognóstico independentes os seguintes parâmetros: idade ($p=0,019$), progressão do tumor da parede ($p<0,001$) e rácio ganglionar ($p<0,001$) [Tabela 15]

Tabela 15. Resumo da análise de regressão de Cox (*Stepwise*) da série global

Parâmetros	HR	IC95% HR	Valor de p
Idade	2,166	1,133 – 4,139	0,019
Progressão da parede (T)	1,49	1,264 – 1,757	<0,001
Rácio ganglionar	3,435	2,081 – 5,669	< 0,001



ANÁLISE POR PERÍODOS

Nesta segunda fase do estudo, foram analisadas as características clínicas e patológicas assim como o estadiamento e as curvas de sobrevida cumulativa de acordo com três períodos de 7 anos [309 casos (24,3%) no primeiro período (1988-1994), 319 (25,1%) no segundo período (1995-2001) e 644 (50,6%) no terceiro período (2002-2008)].

Caracterização clínica

Observaram-se diferenças significativas ($p < 0,001$) na comparação dos casos de acordo com a idade e os períodos em estudo, com idades mais jovens (idade média $61,94 \pm 14,63$ anos) no primeiro período (1988-94) em comparação com os dois períodos seguintes (idades médias $64,82 \pm 13,19$ anos e $65,38 \pm 13,45$ anos) [Tabela 16].

Tabela 16. Distribuição dos casos nos três períodos de acordo com os grupos etários

Idade	Períodos			Total n (%)
	1988-1994 n (%)	1995-2001 n (%)	2002-2008 n (%)	
≤ 45 anos	50 (16,23%)	32 (10,06%)	51 (8,10%)	133 (10,59%)
> 45 anos	258 (83,77%)	286 (89,94%)	579 (91,90%)	1123 (89,41%)
Total	308	318	630	1256
Valor de p	Global	1988-94/1995-01	1995-01/2002-08	1988-94/2002-08
	0,001 ($p < 0,05$)	0,024 ($p < 0,05$)	0,331 ($p = ns$)	<0,001 ($p < 0,05$)

Na distribuição dos casos nos três períodos de acordo com o sexo não houve diferenças significativas, havendo um predomínio do sexo masculino (entre 62,42% e 66,14%) em todos os períodos [Tabela 17].

Tabela 17. Distribuição dos casos nos três períodos de acordo com o sexo dos doentes

Sexo	Períodos			Total n (%)
	1988-1994 n (%)	1995-2001 n (%)	2002-2008 n (%)	
Masculino	199 (64,40%)	211 (66,14%)	402 (62,42%)	812 (63,84%)
Feminino	110 (35,60%)	108 (33,86%)	242 (37,58%)	460 (36,16%)
Total	309	319	644	1272
Valor de p	Global	1988-94/1995-01	1995-01/2002-08	1988-94/2002-08
	0,513 ($p = ns$)	0,675 ($p = ns$)	0,286 ($p = ns$)	0,567 ($p = ns$)

Em relação à localização dos tumores não existiram diferenças significativas entre os vários períodos. Os tumores distais (do antro) constituíram a localização mais frequente nos três períodos em estudo e a incidência dos tumores mais proximais (JEG) manteve-se estável ao longo do tempo [Tabela 18].



Tabela 18. Distribuição dos casos nos três períodos de acordo com a localização tumoral

Localização	Períodos			Total n (%)
	1988-1994 n (%)	1995-2001 n (%)	2002-2008 n (%)	
JEG	60 (24,49%)	65 (23,90%)	107 (24,32%)	232 (24,24%)
Fundo/Corpo	64 (26,12%)	75 (27,57%)	97 (22,05%)	236 (24,66%)
Antro	121 (49,39%)	132 (48,53%)	236 (53,64%)	489 (51,10%)
Total	245	272	440	957
Valor de p	Global	1988-94/1995-01	1995-01/2002-08	1988-94/2002-08
	0,488 (<i>p=ns</i>)	0,933 (<i>p=ns</i>)	0,216 (<i>p=ns</i>)	0,424 (<i>p=ns</i>)

Apesar de não haver diferenças significativas na ressecabilidade dos tumores nos três períodos, esta foi aumentando ao longo do tempo, de 62,46% no primeiro período para 68,63% no último período ($p=0,066$) [Tabela 19]. Relativamente à taxa de inoperabilidade, observaram-se diferenças significativas ($p<0,0001$) entre os três períodos, com uma diminuição progressiva dos casos considerados inoperáveis (17,86% vs 14,42% vs 13,49%). Por outro lado, a percentagem de doentes submetidos a cirurgia de não ressecção também variou ao longo do tempo (19,4% vs 21% vs 18,1%).

Tabela 19. Distribuição dos casos nos três períodos de acordo com a ressecabilidade do tumor

Ressecabilidade	Períodos			Total n (%)
	1988-1994 n (%)	1995-2001 n (%)	2002-2008 n (%)	
Ressecável	193 (62,46%)	206 (64,58%)	442 (68,63%)	841 (66,12%)
Irressecável	116 (37,54%)	113 (35,42%)	202 (31,37%)	431 (33,88%)
Total	309	319	644	1272
Valor de p	Global	1988-94/1995-01	1995-01/2002-08	1988-94/2002-08
	0,135 (<i>p=ns</i>)	0,619 (<i>p=ns</i>)	0,215 (<i>p=ns</i>)	0,066 (<i>p=ns</i>)

Observaram-se diferenças significativas ($p<0,001$) na comparação dos casos de acordo com a tipo de ressecção e os períodos em estudo, com um aumento ao longo do tempo das ressecções do tipo R0 (64,81%, 71,9% e 84,76%) e uma diminuição das ressecções dos tipos R1 e R2 (20,37%, 14,05%, 9,89% e 14,81%, 14,05%, 5,35%, respectivamente) [Tabela 20].

Tabela 20. Distribuição dos casos nos três períodos de acordo com o tipo de ressecção

Tipo de Ressecção	Períodos			Total n (%)
	1988-1994 n (%)	1995-2001 n (%)	2002-2008 n (%)	
R0	35 (64,81%)	87 (71,90%)	317 (84,76%)	439 (79,96%)
R1	11 (20,37%)	17 (14,05%)	37 (9,89%)	65 (11,84%)
R2	8 (14,81%)	17 (14,05%)	20 (5,35%)	45 (8,20%)
Total	54	121	374	549
Valor de p	Global	1988-94/1995-01	1995-01/2002-08	1988-94/2002-08
	<0,001 (<i>p<0,05</i>)	0,544 (<i>p=ns</i>)	0,002 (<i>p<0,05</i>)	0,001 (<i>p<0,05</i>)



Não se observaram diferenças significativas na distribuição dos casos pelos diferentes períodos de acordo com o tipo de cirurgia dos tumores da JEG. Nos tumores do estômago, verificou-se a presença de diferenças significativas no tipo de cirurgia ($p=0,004$) bem como no tipo de cirurgia de ressecção gástrica ($p<0,001$), com um aumento da cirurgia de ressecção (73,96%, 74,06% vs 83,45%) e do número de gastrectomias totais (36,62%, 41,04% vs 51,79%) ao longo do tempo e, por conseguinte, uma diminuição do número de gastrectomias subtotais distais (55,63%, 54,14% vs 45,73%) [Tabela 21].

Tabela 21. Distribuição dos casos nos três períodos de acordo com o tipo de cirurgia

Tipo de Cirurgia	Períodos			Total n (%)
	1988-1994 n (%)	1995-2001 n (%)	2002-2008 n (%)	
JEG				
Ressecção	49 (85,96%)	43 (84,31%)	57 (82,61%)	149 (84,18%)
Não ressecção	8 (14,04%)	8 (15,69%)	12 (17,39%)	28 (15,82%)
Total	58	51	69	178
Valor de p	Global	1988-94/1995-01	1995-01/2002-08	1988-94/2002-08
	0,857 (<i>p=ns</i>)	0,793 (<i>p=ns</i>)	1 (<i>p=ns</i>)	0,632 (<i>p=ns</i>)
Cirurgia de Ressecção da JEG				
Op. Lortat-Jacob	35 (71,43%)	30 (69,77%)	40 (70,18%)	105 (70,47%)
Op. Sweet	9 (18,37%)	4 (9,30%)	3 (5,26%)	16 (10,74%)
Op. Ivor-Lewis	2 (4,08%)	2 (4,65%)	6 (10,53%)	10 (6,71%)
Esofagogastrectomia Trans-hiatal	3 (6,12%)	7 (16,28%)	8 (14,04%)	18 (12,08%)
Total	49	43	57	149
Valor de p	Global	1988-94/1995-01	1995-01/2002-08	1988-94/2002-08
	0,227 (<i>p=ns</i>)	0,354 (<i>p=ns</i>)	0,634 (<i>p=ns</i>)	0,085 (<i>p=ns</i>)
Estômago				
Ressecção	142 (73,96%)	157 (74,06%)	363 (83,45%)	662 (78,9%)
Não ressecção	50 (26,04%)	55 (25,94%)	72 (16,55%)	177 (21,1%)
Total	192	214	435	841
Valor de p	Global	1988-94/1995-01	1995-01/2002-08	1988-94/2002-08
	0,004 (<i>p<0,05</i>)	1 (<i>p=ns</i>)	0,008 (<i>p<0,05</i>)	0,008 (<i>p<0,05</i>)
Cirurgia de Ressecção Gástrica				
Gastrectomia Total	52 (36,62%)	66 (42,04%)	188 (51,79%)	306 (46,22%)
Gastrectomia Subtotal				
Distal	79 (55,63%)	85 (54,14%)	166 (45,73%)	330 (49,85%)
Degastrogastrectomia	11 (7,75%)	6 (3,82%)	9 (2,48%)	26 (3,93%)
Total	142	157	363	662
Valor de p	Global	1988-94/1995-01	1995-01/2002-08	1988-94/2002-08
	0,001 (<i>p<0,05</i>)	0,221 (<i>p=ns</i>)	0,029 (<i>p<0,05</i>)	0,001 (<i>p<0,05</i>)

Em relação à linfadenectomia segundo a classificação de Siewert, verificaram-se diferenças significativas ($p<0,001$) entre os diferentes períodos, com um aumento das linfadenectomias mais alargadas (D2) no último período (45,64%) em comparação com os períodos anteriores (18,5% e 25%). Na classificação Japonesa (topográfica) também se verificaram diferenças significativas ($p<0,001$) entre os três períodos em estudo, com a mesma tendência para linfadenectomia mais alargadas (D2) ao longo do tempo (35,25%, 50% e 63,4%). Relativamente



ao número de gânglios estudados, observaram-se diferenças significativas ($p < 0,001$) entre os períodos, com um aumento do número de gânglios estudados ao longo dos períodos ($16,99 \pm 10,62$ gânglios, $20,1 \pm 11,67$ gânglios e $26,63 \pm 13,94$ gânglios) assim como do número de casos com mais de 15 gânglios estudados (50,87%, 61,7% e 79,65%) [Tabela 22].

Tabela 22. Distribuição dos casos nos três períodos de acordo com o tipo de linfadenectomia e com o número de gânglios estudados

Linfadenectomia	Períodos			Total n (%)
	1988-1994 n (%)	1995-2001 n (%)	2002-2008 n (%)	
Siewert				
D1 (≤25)	141 (81,50%)	141 (75,00%)	187 (54,36%)	469 (66,52%)
D2 (>25)	32 (18,50%)	47 (25,00%)	157 (45,64%)	236 (33,48%)
Total	173	188	344	705
Valor de p	Global	1988-94/1995-01	1995-01/2002-08	1988-94/2002-08
	<0,001 (p<0,05)	0,161 (p=ns)	<0,001 (p<0,05)	<0,001 (p<0,05)
Japonesa				
D0	7 (5,74%)	5 (2,84%)	2 (0,65%)	14 (2,31%)
D1	72 (59,02%)	83 (47,16%)	111 (35,92%)	266 (43,82%)
D2	43 (35,25%)	88 (50,00%)	196 (63,43%)	327 (53,87%)
Total	122	176	309	607
Valor de p	Global	1988-94/1995-01	1995-01/2002-08	1988-94/2002-08
	<0,001 (p<0,05)	0,03 (p<0,05)	0,005 (p<0,05)	<0,001 (p<0,05)
Número de gânglios estudados				
≤15	85 (49,13%)	72 (38,30%)	70 (20,35%)	227 (32,20%)
>15	88 (50,87%)	116 (61,70%)	274 (79,65%)	478 (67,80%)
Total	173	188	344	705
Valor de p	Global	1988-94/1995-01	1995-01/2002-08	1988-94/2002-08
	<0,001 (p<0,05)	<0,001 (p<0,05)	<0,001 (p<0,05)	<0,001 (p<0,05)

Caracterização patológica

Não se verificaram diferenças significativas quanto às dimensões do tumor nos vários períodos ($5,88 \pm 3,36$ cm, $5,89 \pm 3,2$ cm e $5,83 \pm 4,13$ cm) [Tabela 23].

Tabela 23. Distribuição dos casos nos três períodos de acordo com as dimensões do tumor

Dimensões	Períodos			Total n (%)
	1988-1994 n (%)	1995-2001 n (%)	2002-2008 n (%)	
≤ 5 cm	89 (48,90%)	86 (46,49%)	172 (52,92%)	347 (50,14%)
> 5 cm	93 (51,10%)	99 (53,51%)	153 (47,08%)	345 (49,86%)
Total	182	185	325	692
Valor de p	Global	1988-94/1995-01	1995-01/2002-08	1988-94/2002-08
	0,349 ($p = ns$)	0,677 ($p = ns$)	0,168 ($p = ns$)	0,405 ($p = ns$)



Em relação à forma macroscópica, observaram-se diferenças significativas ($p<0,001$) na comparação dos três períodos. O último período (2002-08) relativamente ao primeiro (1988-94) apresentou menos tumores vegetantes e ulcerados (8,44% vs 12,22% e 20,31% vs 34,44%, respectivamente) e mais tumores ulcero-infiltrativos (36,56% vs 20,56%). Na comparação entre o segundo (1995-01) e o último período (2002-08), observaram-se diferenças nos tumores ulcerados (37,97% vs 20,31%), nos tumores infiltrativos (5,35% vs 10,63%), nos tumores ulcero-vegetantes e ulcero-infiltrativos (18,72% vs 24,06% e 29,41% vs 36,56%, respectivamente) [Tabela 24].

Tabela 24. Distribuição dos casos nos três períodos de acordo com a forma macroscópica

Forma macroscópica	Períodos			Total n (%)
	1988-1994 n (%)	1995-2001 n (%)	2002-2008 n (%)	
Vegetante	22 (12,22%)	16 (8,56%)	27 (8,44%)	65 (9,46%)
Ulcerada	62 (34,44%)	71 (37,97%)	65 (20,31%)	198 (28,82%)
Infiltrativa	17 (9,44%)	10 (5,35%)	34 (10,63%)	61 (8,88%)
Ulcero-vegetante	42 (23,33%)	35 (18,72%)	77 (24,06%)	154 (22,42%)
Ulcero-infiltrativa	37 (20,56%)	55 (29,41%)	117 (36,56%)	209 (30,42%)
Total	180	187	320	687
Valor de p	Global	1988-94/1995-01	1995-01/2002-08	1988-94/2002-08
	<0,001 ($p<0,05$)	0,116 ($p=ns$)	<0,001 ($p<0,05$)	<0,001 ($p<0,05$)

A distribuição dos casos de acordo com a classificação da OMS apresentou diferenças significativas ($p<0,001$) entre os três períodos, com uma diminuição dos tumores tubulares (65,59% vs 63,02% vs 50%) e um aumento dos tumores mistos (0% vs 1,56% vs 13,55%) ao longo do tempo. Os tumores com células isoladas em anel de sinete não apresentaram variações significativas nos três períodos (29,03% vs 30,21% vs 30,72%) [Tabela 25].

Tabela 25. Distribuição dos casos nos três períodos de acordo com a classificação da OMS

Classificação da OMS	Períodos			Total n (%)
	1988-1994 n (%)	1995-2001 n (%)	2002-2008 n (%)	
Tubular	122 (65,59%)	121 (63,02%)	166 (50,00%)	409 (57,61%)
<i>Bem-moderadamente diferenciado</i>	96 (51,61%)	102 (53,13%)	162 (48,80%)	360 (50,70%)
<i>Pouco diferenciado</i>	26 (13,98%)	19 (9,90%)	4 (1,20%)	49 (6,90%)
Células isoladas em anel de sinete	54 (29,03%)	58 (30,21%)	102 (30,72%)	214 (30,14%)
Mucinosos	8 (4,30%)	10 (5,21%)	12 (3,61%)	30 (4,23%)
Adenoescamosos	2 (1,08%)	0 (0,00%)	5 (1,51%)	7 (0,99%)
Medular rico em estroma linfóide	0 (0,00%)	0 (0,00%)	2 (0,60%)	2 (0,28%)
Mistos	0 (0,00%)	3 (1,56%)	45 (13,55%)	48 (6,76%)
Total	186	192	332	710
Valor de p	Global	1988-94/1995-01	1995-01/2002-08	1988-94/2002-08
	<0,001 ($p<0,05$)	0,527 ($p=ns$)	<0,001 ($p<0,05$)	<0,001 ($p<0,05$)



Segundo a classificação de Laurén, a distribuição dos casos nos três períodos apresentou diferenças significativas ($p<0,0001$) com uma diminuição dos tumores do tipo intestinal (56,11% vs 52,15% vs 43,88%) e um aumento dos tumores não classificáveis (15,56% vs 29,57% vs 31,34%) ao longo do tempo. Os tumores do tipo difuso apresentaram um padrão diferente dos anteriores, com uma diminuição entre o primeiro e o segundo períodos (28,33% vs 18,28%) e um aumento posterior entre o segundo e o terceiro períodos (18,28% vs 24,78%) [Tabela 26].

Tabela 26. Distribuição dos casos nos três períodos de acordo com a classificação de Laurén

Classificação de Laurén	Períodos			Total n (%)
	1988-1994 n (%)	1995-2001 n (%)	2002-2008 n (%)	
Intestinal	101 (56,11%)	97 (52,15%)	147 (43,88%)	345 (49,22%)
Difuso	51 (28,33%)	34 (18,28%)	83 (24,78%)	168 (23,97%)
Não classificável	28 (15,56%)	55 (29,57%)	105 (31,34%)	188 (26,82%)
Total	180	186	335	701
Valor de p	Global	1988-94/1995-01	1995-01/2002-08	1988-94/2002-08
	0,001 ($p<0,05$)	0,002 ($p<0,05$)	0,128 ($p=ns$)	<0,001 ($p<0,05$)

Observaram-se diferenças significativas ($p<0,001$) na distribuição dos casos nos diferentes períodos de acordo com a classificação proposta por Carneiro e colaboradores. O segundo período (1995-01) apresentou diferenças significativas na comparação com o primeiro ($p=0,04$) e com o terceiro ($p<0,001$) períodos, com menos tumores glandulares (22,95% vs 37,42% e 41,2%, respectivamente) e tumores com células isoladas (9,84% vs 16,13% e 21,93%, respectivamente), e uma percentagem superior de tumores mistos (50,82% vs 38,06% e 31,89%, respectivamente) e de tumores sólidos (16,39% vs 8,39% e 4,98%, respectivamente) [Tabela 27].

Tabela 27. Distribuição dos casos nos três períodos de acordo com a classificação de Carneiro e colaboradores

Classificação de Carneiro e colaboradores	Períodos			Total n (%)
	1988-1994 n (%)	1995-2001 n (%)	2002-2008 n (%)	
Glandular	58 (37,42%)	14 (22,95%)	124 (41,20%)	196 (37,91%)
Misto	59 (38,06%)	31 (50,82%)	96 (31,89%)	186 (35,98%)
Células isoladas	25 (16,13%)	6 (9,84%)	66 (21,93%)	97 (18,76%)
Sólidos	13 (8,39%)	10 (16,39%)	15 (4,98%)	38 (7,35%)
Total	155	61	301	517
Valor de p	Global	1988-94/1995-01	1995-01/2002-08	1988-94/2002-08
	0,001 ($p<0,05$)	0,04 ($p<0,05$)	<0,001 ($p<0,05$)	0,16 ($p=ns$)

Em relação à classificação de Ming observaram-se diferenças significativas ($p<0,001$) entre os três períodos, com uma diminuição da percentagem dos tumores expansivos (31,64% e 35,96% vs 18,15%) e uma aumento da percentagem dos tumores infiltrativos (67,23% e 58,99% vs 78,46%) na comparação entre o primeiro (1998-94) e segundo períodos (1995-01) com o último período (20012-08) [Tabela 28].



Tabela 28. Distribuição dos casos nos três períodos de acordo com a classificação de Ming

Classificação de Ming	Períodos			Total n (%)
	1988-1994 n (%)	1995-2001 n (%)	2002-2008 n (%)	
Expansivo	56 (31,64%)	64 (35,96%)	59 (18,15%)	179 (26,32%)
Infiltrativo	119 (67,23%)	105 (58,99%)	255 (78,46%)	479 (70,44%)
Não classificável	2 (1,13%)	9 (5,06%)	11 (3,38%)	22 (3,24%)
Total	177	178	325	680
Valor de p	Global	1988-94/1995-01	1995-01/2002-08	1988-94/2002-08
	<0,001 (<i>p</i><0,05)	0,053 (<i>p</i> =ns)	<0,001 (<i>p</i><0,05)	0,001 (<i>p</i><0,05)

A distribuição dos casos de acordo com a invasão venosa apresentou diferenças significativas ($p=0,011$) entre os diferentes períodos, com um aumento do número de casos com invasão venosa na comparação do primeiro (47,57%) com o segundo e terceiro períodos (61,14% e 59,71%, respectivamente) [Tabela 29].

Tabela 29. Distribuição dos casos nos três períodos de acordo com a invasão venosa

Invasão Venosa	Períodos			Total n (%)
	1988-1994 n (%)	1995-2001 n (%)	2002-2008 n (%)	
Presente	88 (47,57%)	118 (61,14%)	203 (59,71%)	409 (56,96%)
Ausente	97 (52,43%)	75 (38,86%)	137 (40,29%)	309 (43,04%)
Total	185	193	340	718
Valor de p	Global	1988-94/1995-01	1995-01/2002-08	1988-94/2002-08
	0,011 (<i>p</i><0,05)	0,01 (<i>p</i><0,05)	0,783 (<i>p</i> =ns)	0,008 (<i>p</i><0,05)

Não se observaram diferenças significativas na distribuição dos casos nos diferentes períodos, de acordo com a permeação linfática, quer tendo em consideração todos tumores, quer considerando apenas os tumores sem metastização ganglionar (N0) [Tabelas 30 e 31].

Tabela 30. Distribuição dos casos nos três períodos de acordo com a permeação linfática

Permeação Linfática	Períodos			Total n (%)
	1988-1994 n (%)	1995-2001 n (%)	2002-2008 n (%)	
Presente	154 (81,91%)	161 (83,42%)	268 (79,53%)	583 (81,20%)
Ausente	34 (18,09%)	32 (16,58%)	69 (20,47%)	135 (18,80%)
Total	188	193	337	718
Valor de p	Global	1988-94/1995-01	1995-01/2002-08	1988-94/2002-08
	0,521 (<i>p</i> =ns)	0,787 (<i>p</i> =ns)	0,302 (<i>p</i> =ns)	0,567 (<i>p</i> =ns)

Tabela 31. Distribuição dos casos nos três períodos de acordo com a permeação linfática nos tumores N0

Permeação Linfática (Tumores N0)	Períodos			Total n (%)
	1988-1994 n (%)	1995-2001 n (%)	2002-2008 n (%)	
Presente	28 (45,2%)	32 (51,6%)	52 (46,8%)	112 (47,7%)
Ausente	34 (54,8%)	30 (48,4%)	59 (53,2%)	123 (52,3%)
Total	62	62	111	235
Valor de p	Global	1988-94/1995-01	1995-01/2002-08	1988-94/2002-08
	0,751 (<i>p</i> =ns)	0,59 (<i>p</i> =ns)	0,635 (<i>p</i> =ns)	0,874 (<i>p</i> =ns)



Em relação à invasão perineural também não se observaram diferenças significativas na distribuição dos casos ao longo dos três períodos [Tabela 32].

Tabela 32. Distribuição dos casos nos três períodos de acordo com a invasão perineural

Invasão Perineural	Períodos			Total n (%)
	1988-1994 n (%)	1995-2001 n (%)	2002-2008 n (%)	
Presente	7 (77,78%)	69 (51,49%)	184 (54,44%)	260 (54,05%)
Ausente	2 (22,22%)	65 (48,51%)	154 (45,56%)	221 (45,95%)
Total	9	134	338	481
Valor de p	Global	1988-94/1995-01	1995-01/2002-08	1988-94/2002-08
	0,299 (<i>p=ns</i>)	0,174 (<i>p=ns</i>)	0,609 (<i>p=ns</i>)	0,194 (<i>p=ns</i>)

Estadiamento

A percentagem de EGC permaneceu estável ao longo do tempo (11,55%, 10,22% e 14,52%), não se verificando diferenças significativas na distribuição dos casos nos períodos em estudo [Tabela 33].

Tabela 33. Distribuição dos casos nos três períodos de acordo com o tipo de carcinoma

Tipo de Carcinoma	Períodos			Total n (%)
	1988-1994 n (%)	1995-2001 n (%)	2002-2008 n (%)	
<i>Early Gastric Cancer</i>	35 (11,55%)	32 (10,22%)	88 (14,52%)	155 (12,68%)
Avançado	268 (88,45%)	281 (89,78%)	518 (85,48%)	1067 (87,32%)
Total	303	313	606	1222
Valor de p	Global	1988-94/1995-01	1995-01/2002-08	1988-94/2002-08
	0,142 (<i>p=ns</i>)	0,607 (<i>p=ns</i>)	0,079 (<i>p=ns</i>)	0,258 (<i>p=ns</i>)

Não se observaram diferenças significativas na distribuição dos casos nos três períodos de acordo com a progressão na parede (T da 7ª Edição da Classificação TNM) [Tabela 34].

Tabela 34. Distribuição dos casos nos três períodos de acordo com a progressão na parede (T)

Classificação TNM	Períodos			Total n (%)
	1988-1994	1995-2001	2002-2008	
	n (%)	n (%)	n (%)	
Progressão na parede (T)				
TNM 7ª Edição (2009)				
T0 - <i>in situ</i>	1 (0,54%)	1 (0,51%)	3 (0,81%)	5 (0,67%)
T1a - lâmina própria	16 (8,65%)	14 (7,18%)	29 (7,86%)	59 (7,88%)
T1b - submucosa	18 (9,73%)	16 (8,21%)	40 (10,84%)	74 (9,88%)
T2 - <i>muscularis propria</i>	20 (10,81%)	12 (6,15%)	34 (9,21%)	66 (8,81%)
T3 - subserosa	62 (33,51%)	74 (37,95%)	123 (33,33%)	259 (34,58%)
T4a - perfura a serosa	59 (31,89%)	61 (31,28%)	118 (31,98%)	238 (31,78%)
T4b - órgãos adjacentes	9 (4,86%)	17 (8,72%)	22 (5,96%)	48 (6,41%)
Total	185	195	369	749
Valor de p	Global	1988-94/1995-01	1995-01/2002-08	1988-94/2002-08
	0,846 (<i>p=ns</i>)	0,476 (<i>p=ns</i>)	0,57 (<i>p=ns</i>)	0,987 (<i>p=ns</i>)



A metastização ganglionar não apresentou diferenças significativas na distribuição dos casos nos períodos em estudo, quer na avaliação da sua presença, quer na classificação TNM de 2009, quer no rácio ganglionar (metastizados/ressecados). Na classificação Japonesa (topográfica) da metastização, observaram-se diferenças significativas ($p=0,007$) na comparação entre o primeiro período (1988-94) e os períodos seguintes (1995-01 e 2002-08), com a presença de mais casos N2 e N3 (26,74% e 4,28%) no primeiro período relativamente aos seguintes (21,72% e 0,51%; 18,38% e 0,84%, respectivamente) [Tabela 35].

Tabela 35. Distribuição dos casos nos três períodos de acordo com a metastização ganglionar (N), TNM 7ª Edição, Rácio ganglionar (metastizados/estudados) e classificação Japonesa (topográfica)

Classificação TNM	Períodos			Total n (%)
	1988-1994 n (%)	1995-2001 n (%)	2002-2008 n (%)	
Metastização ganglionar (N)				
Presente	125 (66,84%)	133 (66,50%)	266 (66,50%)	524 (66,58%)
Ausente	62 (33,16%)	67 (33,50%)	134 (33,50%)	263 (33,42%)
Total	187	200	400	787
Valor de p	Global	1988-94/1995-01	1995-01/2002-08	1988-94/2002-08
	0,996 (<i>p=ns</i>)	1 (<i>p=ns</i>)	1 (<i>p=ns</i>)	1 (<i>p=ns</i>)
TNM 7ª Edição (2009)				
N0 (0)	62 (34,44%)	67 (34,01%)	134 (34,90%)	263 (34,56%)
N1 (1-2)	37 (20,56%)	40 (20,30%)	58 (15,10%)	135 (17,74%)
N2 (3-6)	31 (17,22%)	37 (18,78%)	53 (13,80%)	121 (15,90%)
N3a (7-15)	29 (16,11%)	36 (18,27%)	89 (23,18%)	154 (20,24%)
N3b (>15)	21 (11,67%)	17 (8,63%)	50 (13,02%)	88 (11,56%)
Total	180	197	384	761
Valor de p	Global	1988-94/1995-01	1995-01/2002-08	1988-94/2002-08
	0,198 (<i>p=ns</i>)	0,87 (<i>p=ns</i>)	0,098 (<i>p=ns</i>)	0,182 (<i>p=ns</i>)
Rácio (metastizados/ressecados)				
≤ 0,2	98 (55,37%)	113 (58,85%)	206 (59,54%)	417 (58,32%)
> 0,2	79 (44,63%)	79 (41,15%)	140 (40,46%)	298 (41,68%)
Total	177	192	346	715
Valor de p	Global	1988-94/1995-01	1995-01/2002-08	1988-94/2002-08
	0,648 (<i>p=ns</i>)	0,528 (<i>p=ns</i>)	0,927 (<i>p=ns</i>)	0,399 (<i>p=ns</i>)
Classificação Japonesa (topográfica)				
N0	62 (33,16%)	68 (34,34%)	133 (37,05%)	263 (35,35%)
N1	67 (35,83%)	86 (43,43%)	157 (43,73%)	310 (41,67%)
N2	50 (26,74%)	43 (21,72%)	66 (18,38%)	159 (21,37%)
N3	8 (4,28%)	1 (0,51%)	3 (0,84%)	12 (1,61%)
Total	187	198	359	744
Valor de p	Global	1988-94/1995-01	1995-01/2002-08	1988-94/2002-08
	0,007 (<i>p<0,05</i>)	0,04 (<i>p<0,05</i>)	0,758 (<i>p=ns</i>)	0,003 (<i>p<0,05</i>)



Em relação ao estadio (TNM 7ª Edição), não se observaram diferenças significativas nos diferentes períodos [Tabela 36].

Tabela 36. Distribuição dos casos nos três períodos de acordo com o estadio

Classificação TNM	Períodos			Total n (%)
	1988-1994	1995-2001	2002-2008	
	n (%)	n (%)	n (%)	
Estadio				
TNM 7ª Edição (2009)				
O	1 (0,56%)	1 (0,52%)	3 (0,80%)	5 (0,67%)
IA	26 (14,53%)	25 (12,89%)	62 (16,49%)	113 (15,09%)
IB	18 (10,06%)	12 (6,19%)	35 (9,31%)	65 (8,68%)
IIA	18 (10,06%)	21 (10,82%)	38 (10,11%)	77 (10,28%)
IIB	18 (10,06%)	27 (13,92%)	33 (8,78%)	78 (10,41%)
IIIA	29 (16,20%)	30 (15,46%)	34 (9,04%)	93 (12,42%)
IIIB	35 (19,55%)	32 (16,49%)	61 (16,22%)	128 (17,09%)
IIIC	24 (13,41%)	27 (13,92%)	68 (18,09%)	119 (15,89%)
IV	10 (5,59%)	19 (9,79%)	42 (11,17%)	71 (9,48%)
Total	179	194	376	749
Valor de p	Global	1988-94/1995-01	1995-01/2002-08	1988-94/2002-08
	0,187 (p=ns)	0,675 (p=ns)	0,138 (p=ns)	0,128 (p=ns)

Análise da sobrevida

Na análise das curvas de sobrevida cumulativa dos doentes nos diferentes períodos [Figura 34], apesar de não se observarem diferenças significativas, verificou-se uma tendência ($p=0,075$) para o aumento das sobrevidas aos 5 anos (26% vs 34% vs 43%) ao longo do tempo [Tabela 37].

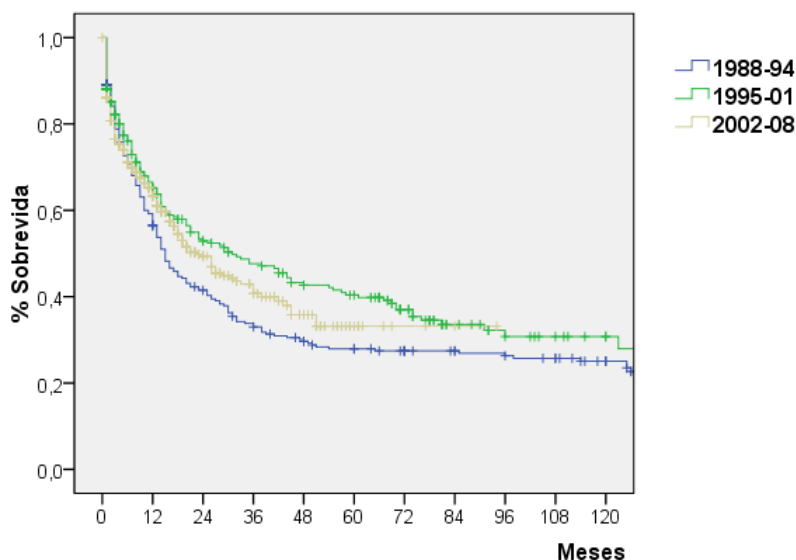


Figura 34. Sobrevida global de acordo com os três períodos em estudo



Tabela 37. Análise da sobrevida por períodos

Sobrevida	Períodos									Valor de p
	1988-94			1995-01			2002-08			log-rank
	Média (meses)	Mediana (meses)	% aos 5 anos	Média (meses)	Mediana (meses)	% aos 5 anos	Média (meses)	Mediana (meses)	% aos 5 anos	
Global	79,5	15	26	59,4	31	34	41,1	23	43	0,075 (<i>p=ns</i>)

Na análise das curvas de sobrevida cumulativa nos diferentes períodos de acordo com os diversos parâmetros clínicos, patológicos, moleculares e de estadiamento [*dados não apresentados na íntegra*], apenas se verificaram diferenças significativas na idade ($p=0,049$; no grupo etário com mais de 45 anos, aumento da sobrevida aos 5 anos: 24% vs 31% vs 43%), na localização tumoral ($p=0,001$; nos tumores de fundo/corpo, aumento da sobrevida aos 5 anos: 15% vs 34% vs 47%) e no tipo de carcinoma ($p=0,04$; nos carcinomas avançados, aumento da sobrevida aos 5 anos: 18% vs 27% vs 38%) [Tabela 38].

Tabela 38. Resumo da análise da sobrevida nos três períodos de acordo com os diversos parâmetros clínicos, patológicos, moleculares e de estadiamento [*apenas parâmetros com diferenças significativas*]

Parâmetros	Períodos									Valor de p	
	1988-94			1995-01			2002-08			Log-rank	
	Média (meses)	Mediana (meses)	% aos 5 anos	Média (meses)	Mediana (meses)	% aos 5 anos	Média (meses)	Mediana (meses)	% aos 5 anos		
Idade											
≤ 45 anos	71	31	36	88,3	-	59	43,2	19	45	0,201	(p=ns)
> 45 anos	71,7	14	24	56	26	31	35,1	23	43	0,049	(p<0,05)
Localização											
JEG	61,3	23	26	55,3	48	51	38,3	20	46	0,233	(p=ns)
Fundo/Corpo	34,9	10	15	59,1	21	34	49	32	47	0,001	(p<0,05)
Antro	113,4	32	40	60,4	35	32	42,3	44	51	0,562	(p=ns)
Tipo de Carcinoma											
EGC	134,3	-	78	120,4	-	79	58,2	-	71	0,246	(p=ns)
Avançado	61	13	18	48,5	21	27	35,5	18	38	0,04	(p<0,05)



ANÁLISE DOS *EARLY GASTRIC CANCER*

Nesta fase do estudo, procedeu à análise dos EGC desta série (155 casos, 12,68%) através da definição do perfil clínico-patológico de acordo com o tipo de carcinoma (EGC vs Avançados) [dados não apresentados na íntegra].

Caracterização clínica

A Tabela 39 resume os parâmetros clínicos em que se observaram diferenças significativas nos EGC em comparação com os tumores avançados.

Em relação à localização ($p < 0,001$), os EGC foram mais frequentes no antro gástrico (70%) e menos frequentes na JEG (10,71%) em comparação com os tumores avançados (47,86% e 26,2%, respectivamente).

Todos os EGC foram ressecáveis, em oposição aos tumores avançados que só foram ressecáveis em 59,61% dos casos ($p < 0,001$).

Em termos de cirurgia de ressecção gástrica, verificou-se uma tendência ($p = 0,065$) para cirurgias menos alargadas (59,56% de gastrectomias subtotais distais vs 38,24% de gastrectomias totais) nos EGC em comparação com os tumores mais avançados (47,49% vs 48,1%, respectivamente).

A cirurgia de ressecção dos EGC foi sempre R0, enquanto nos tumores avançados foi R0 em 73,07% dos casos ($p < 0,001$).

Nas cirurgias de ressecção, foram necessárias linfadenectomias menos alargadas [quer segundo a classificação de Siewert ($p = 0,008$), quer segundo a classificação Japonesa ($p < 0,001$)] nos EGC (76,12% D1 na classificação de Siewert e 48,72% D1 na classificação Japonesa) em comparação com os tumores mais avançados (64,21% e 42,62%, respectivamente).



Tabela 39. Resumo da caracterização clínica de acordo com o tipo de carcinoma (EGC vs Avançados)

Parâmetros	Tipo de Carcinoma		Total n (%)	Valor de p
	EGC n (%)	Avançados n (%)		
Localização				
JEG	15 (10,71%)	208 (26,20%)	223 (23,88%)	<0,001 (p<0,05)
Fundo/Corpo	27 (19,29%)	206 (25,94%)	233 (24,95%)	
Antro	98 (70,00%)	380 (47,86%)	478 (51,18%)	
Total	140	794	934	
Ressecabilidade				
Ressecável	155 (100,00%)	636 (59,61%)	791 (64,73%)	<0,001 (p<0,05)
Irressecável	0 (0,00%)	431 (40,39%)	431 (35,27%)	
Total	155	1067	1222	
Tipo de Cirurgia				
Cirurgia de Ressecção Gástrica				
Gastrectomia Total	52 (38,24%)	240 (48,10%)	292 (45,98%)	0,065 (p=ns)
Gastrectomia Subtotal Distal	81 (59,56%)	237 (47,49%)	318 (50,08%)	
Degastrogastrectomia	3 (2,21%)	22 (4,41%)	25 (3,94%)	
Total	136	499	635	
Tipo de Ressecção				
R0	138 (100,00%)	293 (73,07%)	431 (79,96%)	<0,001 (p<0,05)
R1	0 (0,00%)	65 (16,21%)	65 (12,06%)	
R2	0 (0,00%)	43 (10,72%)	43 (7,98%)	
Total	138	401	539	
Linfadenectomia				
Siewert				
D1 (≤25)	102 (76,12%)	366 (64,21%)	468 (66,48%)	0,008 (p<0,05)
D2 (>25)	32 (23,88%)	204 (35,79%)	236 (33,52%)	
Total	134	570	704	
Japonesa				
D0	10 (8,55%)	4 (0,83%)	14 (2,34%)	<0,001 (p<0,05)
D1	57 (48,72%)	205 (42,62%)	262 (43,81%)	
D2	50 (42,74%)	272 (56,55%)	322 (53,85%)	
Total	117	481	598	



Caracterização patológica

A Tabela 40 mostra os parâmetros patológicos em que se observaram diferenças significativas na comparação entre os EGC e os tumores avançados.

Os EGC apresentavam dimensões menores ($2,61 \pm 1,79$ cm) em comparação com os tumores avançados ($6,56 \pm 3,63$ cm).

Em relação à forma macroscópica, nos EGC observou-se uma percentagem de tumores vegetantes (22,03%) e de tumores ulcerados (57,63%) significativamente mais elevado do que a observada nos tumores avançados (6,85% e 22,85%, respectivamente). Por outro lado, as formas infiltrativa, ulcero-vegetante e ulcero-infiltrativa foram menos frequentes nos EGC (5,93%, 3,39% e 11,02%, respectivamente) em comparação com os tumores avançados (9,49%, 26,36% e 34,45%, respectivamente).

Tendo em consideração a classificação da OMS, os EGC foram classificados mais vezes como tumores tubulares bem a moderadamente diferenciados (61,72%) do que os tumores avançados (48,19%), e como pouco diferenciados numa percentagem inferior (1,56% vs 8,09%).

Os EGC foram mais frequentemente do tipo intestinal (60,32%) e menos vezes não classificáveis (13,49%) de acordo com a classificação de Laurén, do que os tumores mais avançados (46,69% e 29,79%, respectivamente).

Segundo a classificação de Carneiro e colaboradores, os EGC foram classificados como glandulares numa percentagem superior (51,61%) e como mistos e sólidos em menos casos (25,81% e 1,08%, respectivamente), em comparação com os tumores avançados (34,91%, 38,21% e 8,73%, respectivamente).

Em relação à classificação de Ming, os EGC comparativamente com os tumores avançados, apresentavam mais vezes um crescimento expansivo (31,36% vs 25,13%, respectivamente) e menos frequentemente um crescimento infiltrativo (60,17% vs 72,73%, respectivamente).

Nos EGC foi significativamente menos frequente a presença quer de invasão venosa (9,7%), quer de permeação linfática (31,82%), quer de invasão perineural (6,74%), quando comparados com os tumores avançados (67,81%, 92,31% e 64,8%, respectivamente). Nos tumores sem metastização ganglionar (N0), apenas 14,1% dos EGC apresentavam permeação linfática em oposição com 72,1% nos tumores avançados.



Tabela 40. Resumo da caracterização patológica de acordo com o tipo de carcinoma (EGC vs Avançados) [apenas parâmetros com diferenças significativas]

Parâmetros	Tipo de Carcinoma		Total n (%)	Valor de p
	EGC n (%)	Avançados n (%)		
Dimensões				
≤ 5 cm	114 (92,68%)	233 (40,95%)	347 (50,14%)	<0,001 (p<0,05)
> 5 cm	9 (7,32%)	336 (59,05%)	345 (49,86%)	
Total	123	569	692	
Forma macroscópica				
Vegetante	26 (22,03%)	39 (6,85%)	65 (9,46%)	<0,001 (p<0,05)
Ulcerada	68 (57,63%)	130 (22,85%)	198 (28,82%)	
Infiltrativa	7 (5,93%)	54 (9,49%)	61 (8,88%)	
Ulcerovogetante	4 (3,39%)	150 (26,36%)	154 (22,42%)	
Ulceroinfiltrativa	13 (11,02%)	196 (34,45%)	209 (30,42%)	
Total	118	569	687	
Classificação da OMS				
Tubular	81 (63,28%)	327 (56,28%)	408 (57,55%)	0,009 (p<0,05)
<i>Bem-moderadamente diferenciado</i>	79 (61,72%)	280 (48,19%)	359 (50,63%)	
<i>Pouco diferenciado</i>	2 (1,56%)	47 (8,09%)	49 (6,91%)	
Células isoladas em anel de sinete	39 (30,47%)	175 (30,12%)	214 (30,18%)	
Mucinosos	1 (0,78%)	29 (4,99%)	30 (4,23%)	
Adenoescamosos	0 (0,00%)	7 (1,20%)	7 (0,99%)	
Medular rico em estroma linfóide	0 (0,00%)	2 (0,34%)	2 (0,28%)	
Mistos	7 (5,47%)	41 (7,06%)	48 (6,77%)	
Total	128	581	709	
Classificação de Laurén				
Intestinal	76 (60,32%)	268 (46,69%)	344 (49,14%)	0,001 (p<0,05)
Difuso	33 (26,19%)	135 (23,52%)	168 (24,00%)	
Não classificável	17 (13,49%)	171 (29,79%)	188 (26,86%)	
Total	126	574	700	
Classificação de Carneiro e colaboradores				
Glandular	48 (51,61%)	148 (34,91%)	196 (37,91%)	0,002 (p<0,05)
Misto	24 (25,81%)	162 (38,21%)	186 (35,98%)	
Células isoladas	20 (21,51%)	77 (18,16%)	97 (18,76%)	
Sólidos	1 (1,08%)	37 (8,73%)	38 (7,35%)	
Total	93	424	517	
Classificação de Ming				
Expansivo	37 (31,36%)	141 (25,13%)	178 (26,22%)	<0,001 (p<0,05)
Infiltrativo	71 (60,17%)	408 (72,73%)	479 (70,54%)	
Não classificável	10 (8,47%)	12 (2,14%)	22 (3,24%)	
Total	118	561	679	
Invasão Venosa				
Presente	13 (9,70%)	396 (67,81%)	409 (56,96%)	<0,001 (p<0,05)
Ausente	121 (90,30%)	188 (32,19%)	309 (43,04%)	
Total	134	584	718	
Permeação Linfática				
Presente	42 (31,82%)	540 (92,31%)	582 (81,17%)	<0,001 (p<0,05)
Ausente	90 (68,18%)	45 (7,69%)	135 (18,83%)	
Total	132	585	717	
Invasão Perineural				
Presente	6 (6,74%)	254 (64,80%)	260 (54,05%)	<0,001 (p<0,05)
Ausente	83 (93,26%)	138 (35,20%)	221 (45,95%)	
Total	89	392	481	



ANÁLISE DOS *EARLY ONSET GASTRIC CANCER*

Procedeu-se à análise dos tumores nos doentes jovens (EOGC) desta série (n=133, 10,59%), com sua caracterização clínico-patológica e sua comparação com os tumores no indivíduos mais velhos (>45 anos). Não se observaram diferenças significativas relativamente ao estadiamento de acordo com os grupos etários [dados não apresentados na íntegra].

Caracterização clínica

A Tabela 41 resume os parâmetros clínicos em que se observaram diferenças significativas entre os indivíduos jovens e os mais velhos.

Os indivíduos mais jovens foram submetidos a cirurgia de ressecção mais extensa (69,7% de gastrectomias totais vs 30,3% de gastrectomias subtotais distais) do que os mais velhos (43,34% e 52,28%, respectivamente), tendo acontecido o mesmo relativamente à extensão da linfadenectomia segundo a classificação Japonesa (71,93% de D2 nos jovens vs 51,91% de D2 nos mais velhos).

Tabela 41. Resumo da caracterização clínico de acordo com os grupos etários [apenas parâmetros com diferenças significativas]

Parâmetros	Idade		Total n (%)	Valor de p
	≤ 45 anos (EOGC) n (%)	> 45 anos n (%)		
Cirurgia de Ressecção Gástrica				
Gastrectomia Total	46 (69,70%)	257 (43,34%)	303 (45,98%)	<0,001 (p<0,05)
Gastrectomia Subtotal Distal	20 (30,30%)	310 (52,28%)	330 (50,08%)	
Degastrogastrectomia	0 (0,00%)	26 (4,38%)	26 (3,95%)	
Total	66	593	659	
Linfadenectomia				
Japonesa				
D0	2 (3,51%)	12 (2,19%)	14 (2,31%)	0,008 (p<0,05)
D1	14 (24,56%)	252 (45,90%)	266 (43,89%)	
D2	41 (71,93%)	285 (51,91%)	326 (53,80%)	
Total	57	549	606	



Caracterização patológica

A Tabela 42 documenta os parâmetros patológicos em que se observaram diferenças significativas na comparação entre os EOGC e os tumores nos indivíduos mais idosos.

Os indivíduos mais jovens apresentaram tumores com dimensões menores ($4,89 \pm 2,7$ cm) do que os carcinomas dos doentes mais velhos ($5,98 \pm 3,79$ cm).

Em relação à forma macroscópica, os EOGC, por um lado, foram classificados como ulcerados (34,72%) e ulcero-infiltrativos (40,28%) mais vezes do que os tumores dos doentes mais velhos (28,18% e 29,15%, respectivamente), por outro lado, os EOGC foram classificados como vegetantes (5,56%), infiltrativos (6,94%) e ulcero-vegetantes (12,5%) numa percentagem inferior em comparação com os tumores dos indivíduos mais idosos (9,93%, 9,12% e 23,62%, respectivamente).

Segundo a classificação da OMS, os EOGC foram classificados como tumores com células isoladas em anel de sinete (56,58%) mais vezes e numa percentagem menor como tubulares (34,21%) comparativamente com os tumores dos doentes mais velhos (26,9% e 60,6%, respectivamente).

Observou-se a mesma tendência na classificação de Laurén, com mais tumores do tipo difuso (55,41%) e menos tumores do tipo intestinal (27,03%) nos EOGC em oposição com os tumores dos mais idosos (20,16% e 52%, respectivamente).

Tendo em consideração a classificação proposta por Carneiro e colaboradores, os EOGC apresentaram uma relação tumores de células isoladas/tumores glandulares de 2,7 : 1, ao contrário dos doentes mais velhos que apresentaram uma relação de 0,39 : 1.

Os EOGC tiveram um crescimento infiltrativo segundo a classificação de Ming numa percentagem significativamente maior (88,57%) do que os tumores dos indivíduos com mais de 45 anos (68,31%).

Os tumores dos indivíduos mais jovens apresentavam menos frequentemente invasão venosa (41,56%) e permeação linfática (71,05%) do que os tumores dos doentes mais velhos (58,91% e 82,37%). Nos tumores sem metastização ganglionar (N0) observa-se a mesma tendência no que diz respeito à permeação linfática, mas sem significado estatístico ($p=0,08$). Não se observaram diferenças significativas relativamente à invasão perineural de acordo com a idade.



Tabela 42. Resumo da caracterização patológica de acordo com os grupos etários

Parâmetros	Idade		Total n (%)	Valor de p
	≤ 45 anos (EOGC) n (%)	> 45 anos n (%)		
Dimensões				
≤ 5 cm	49 (66,22%)	297 (48,14%)	346 (50,07%)	0,004 (p<0,05)
> 5 cm	25 (33,78%)	320 (51,86%)	345 (49,93%)	
Total	74	617	691	
Forma macroscópica				
Vegetante	4 (5,56%)	61 (9,93%)	65 (9,48%)	0,067 (p=ns)
Ulcerada	25 (34,72%)	173 (28,18%)	198 (28,86%)	
Infiltrativa	5 (6,94%)	56 (9,12%)	61 (8,89%)	
Ulcerado-vegetante	9 (12,50%)	145 (23,62%)	154 (22,45%)	
Ulcerado-infiltrativa	29 (40,28%)	179 (29,15%)	208 (30,32%)	
Total	72	614	686	
Classificação da OMS				
Tubular	26 (34,21%)	383 (60,60%)	409 (57,77%)	<0,001 (p<0,05)
<i>Bem-moderadamente diferenciado</i>	21 (27,63%)	339 (53,64%)	360 (50,85%)	
<i>Pouco diferenciado</i>	5 (6,58%)	44 (6,96%)	49 (6,92%)	
Células isoladas em anel de sinete	43 (56,58%)	170 (26,90%)	213 (30,08%)	
Mucinosos	6 (7,89%)	24 (3,80%)	30 (4,24%)	
Adenoescamosos	0 (0,00%)	7 (1,11%)	7 (0,99%)	
Medular rico em estroma linfóide	0 (0,00%)	2 (0,32%)	2 (0,28%)	
Mistos	1 (1,32%)	46 (7,28%)	47 (6,64%)	
Total	76	632	708	
Classificação de Laurén				
Intestinal	20 (27,03%)	325 (52,00%)	345 (49,36%)	<0,001 (p<0,05)
Difuso	41 (55,41%)	126 (20,16%)	167 (23,89%)	
Não classificável	13 (17,57%)	174 (27,84%)	187 (26,75%)	
Total	74	625	699	
Classificação de Carneiro e colaboradores				
Glandular	9 (15,79%)	187 (40,83%)	196 (38,06%)	<0,001 (p<0,05)
Misto	21 (36,84%)	164 (35,81%)	185 (35,92%)	
Células isoladas	24 (42,11%)	72 (15,72%)	96 (18,64%)	
Sólidos	3 (5,26%)	35 (7,64%)	38 (7,38%)	
Total	57	458	515	
Classificação de Ming				
Expansivo	5 (7,14%)	174 (28,57%)	179 (26,36%)	0,001 (p<0,05)
Infiltrativo	62 (88,57%)	416 (68,31%)	478 (70,40%)	
Não classificável	3 (4,29%)	19 (3,12%)	22 (3,24%)	
Total	70	609	679	
Invasão Venosa				
Presente	32 (41,56%)	377 (58,91%)	409 (57,04%)	0,005 (p<0,05)
Ausente	45 (58,44%)	263 (41,09%)	308 (42,96%)	
Total	77	640	717	
Permeação Linfática				
Presente	54 (71,05%)	528 (82,37%)	582 (81,17%)	0,029 (p<0,05)
Ausente	22 (28,95%)	113 (17,63%)	135 (18,83%)	
Total	76	641	717	



ANÁLISE SEGUNDO A CLASSIFICAÇÃO DE LAURÉN

Foi realizada a análise da caracterização clínico-patológico e do estadiamento segundo os tipos intestinal e difuso da classificação de Laurén. Foram analisados 513 casos distribuídos da seguinte forma: 345 carcinomas do tipo intestinal (67,25%) e 168 do tipo difuso (32,75%) [dados não apresentados na íntegra].

Caracterização clínica

A Tabela 43 mostra os parâmetros clínicos que em se observaram diferenças significativas entre os tumores do tipo intestinal e os do tipo difuso.

Como foi referido anteriormente (*vide supra*), os indivíduos jovens apresentaram mais frequentemente carcinomas do tipo difuso.

Os carcinomas do tipo difuso apresentam uma relação sexo masculino/feminino de 1,3 : 1 em oposição aos tumores do tipo intestinal que apresentaram uma relação de 1,7 : 1.

Os tumores do tipo difuso foram menos frequentes (12,34%) na JEG em comparação com os carcinomas do tipo intestinal (23,1%).

Em relação ao tipo de cirurgia de ressecção gástrica, nos carcinomas do tipo difuso foram realizadas cirurgias mais extensas (71,81% de gastrectomias totais vs 26,85% de gastrectomias subtotais distais) ao contrário do que aconteceu nos tumores do tipo intestinal (32,84% de gastrectomias totais vs 61,57% de gastrectomia subtotais distais).

No que diz respeito ao tipo de ressecção, observaram-se diferenças significativas, com uma maior percentagem de ressecções R0 nos tumores do tipo intestinal (85,53%) em comparação com os carcinomas do tipo difuso (71,05%).

Nos carcinomas do tipo difuso foram realizadas linfadenectomias mais alargadas (D2), quer na classificação de Siewert (41,25%), quer na classificação Japonesa (60,56%) comparativamente com os tumores intestinais (29,73% e 49,44%, respectivamente).



Tabela 43. Resumo da caracterização clínica de acordo com a classificação de Laurén

Parâmetros	Tipo de Laurén		Total n (%)	Valor de p
	Intestinal n (%)	Difuso n (%)		
Idade				
≤ 45 anos	20 (5,80%)	41 (24,55%)	61 (11,91%)	<0,001 (p<0,05)
> 45 anos	325 (94,20%)	126 (75,45%)	451 (88,09%)	
Total	345	167	512	
Sexo				
Masculino	218 (63,19%)	94 (55,95%)	312 (60,82%)	0,124 (p=ns)
Feminino	127 (36,81%)	74 (44,05%)	201 (39,18%)	
Total	345	168	513	
Localização				
JEG	76 (23,10%)	19 (12,34%)	95 (19,67%)	0,021 (p<0,05)
Fundo/Corpo	78 (23,71%)	40 (25,97%)	118 (24,43%)	
Antro	175 (53,19%)	95 (61,69%)	270 (55,90%)	
Total	329	154	483	
Cirurgia de Ressecção Gástrica				
Gastrectomia Total	88 (32,84%)	107 (71,81%)	195 (46,76%)	<0,001 (p<0,05)
Gastrectomia Subtotal Distal	165 (61,57%)	40 (26,85%)	205 (49,16%)	
Degastrogastrectomia	15 (5,60%)	2 (1,34%)	17 (4,08%)	
Total	268	149	417	
Tipo de Ressecção				
R0	201 (85,53%)	81 (71,05%)	282 (80,80%)	0,005 (p<0,05)
R1	20 (8,51%)	21 (18,42%)	41 (11,75%)	
R2	14 (5,96%)	12 (10,53%)	26 (7,45%)	
Total	235	114	349	
Linfadenectomia				
Siewert				
D1 (≤25)	234 (70,27%)	94 (58,75%)	328 (66,53%)	0,014 (p<0,05)
D2 (>25)	99 (29,73%)	66 (41,25%)	165 (33,47%)	
Total	333	160	493	
Japonesa				
D0	7 (2,62%)	2 (1,41%)	9 (2,20%)	0,09 (p=ns)
D1	128 (47,94%)	54 (38,03%)	182 (44,50%)	
D2	132 (49,44%)	86 (60,56%)	218 (53,30%)	
Total	267	142	409	

Caracterização patológica

A Tabela 44 documenta os parâmetros patológicos que em se observaram diferenças significativas na comparação entre os tumores do tipo intestinal e os do tipo difuso.

Em relação à forma macroscópica, os carcinomas do tipo difuso foram mais vezes infiltrativos (16,77%) e ulcero-infiltrativos (40,99%) em comparação com os tumores do tipo intestinal (4,91% e 23,01%, respectivamente). Por outro lado, os tumores intestinais foram mais vezes ulcero-vegetantes (26,38%) e vegetantes (16,26%) do que os tumores do tipo difuso (9,94% e 1,24%, respectivamente).



De acordo com a classificação de Ming, os tumores do tipo difuso foram classificados como infiltrativos numa percentagem significativamente superior (96,95%) em comparação com os carcinomas do tipo intestinal (58,54%).

A invasão venosa foi mais frequente nos tumores do tipo intestinal (56,01%) comparativamente com os carcinomas do tipo difuso (44,24%). Pelo contrário, a invasão perineural foi mais frequente nos tumores do tipo difuso (69,23%) em comparação com os carcinomas do tipo intestinal (39,82%). No que diz respeito à permeação linfática, não se observaram diferenças significativas entre estes dois subtipos da classificação de Laurén. No entanto, nos tumores sem metastização ganglionar (N0) observaram-se diferenças significativas na presença de permeação linfática ($p=0,041$) entre o tipo difuso (27%) e o tipo intestinal (46%) da classificação de Laurén.

Tabela 44. Resumo da caracterização patológica de acordo com a classificação de Laurén [apenas parâmetros com diferenças significativas]

Parâmetros	Tipo de Laurén		Total n (%)	Valor de p
	Intestinal n (%)	Difuso n (%)		
Forma macroscópica				
Vegetante	53 (16,26%)	2 (1,24%)	55 (11,29%)	<0,001 (p<0,05)
Ulcerada	96 (29,45%)	50 (31,06%)	146 (29,98%)	
Infiltrativa	16 (4,91%)	27 (16,77%)	43 (8,83%)	
Ulcerovo-vegetante	86 (26,38%)	16 (9,94%)	102 (20,94%)	
Ulcerovo-infiltrativa	75 (23,01%)	66 (40,99%)	141 (28,95%)	
Total	326	161	487	
Classificação de Ming				
Expansivo	125 (38,11%)	4 (2,44%)	129 (26,22%)	0,001 (p<0,05)
Infiltrativo	192 (58,54%)	159 (96,95%)	351 (71,34%)	
Não classificável	11 (3,35%)	1 (0,61%)	12 (2,44%)	
Total	328	164	492	
Invasão Venosa				
Presente	191 (56,01%)	73 (44,24%)	264 (52,17%)	0,014 (p<0,05)
Ausente	150 (43,99%)	92 (55,76%)	242 (47,83%)	
Total	341	165	506	
Invasão Perineural				
Presente	88 (39,82%)	72 (69,23%)	160 (49,23%)	<0,001 (p<0,05)
Ausente	133 (60,18%)	32 (30,77%)	165 (50,77%)	
Total	40	440	480	

Estadiamento

A Tabela 45 documenta o estadiamento de acordo com os tipos intestinal e difuso da classificação de Laurén.

Os tumores do tipo difuso associaram-se a categorias mais avançadas em todos os parâmetros do estadiamento [progressão na parede (T), metastização ganglionar (N) e estadio].



Tabela 45. Estadiamento de acordo com classificação de Laurén

Parâmetros	Tipo de Laurén		Total n (%)	Valor de p
	Intestinal n (%)	Difuso n (%)		
Classificação TNM				
Progressão na parede (T)				
TNM 7ª Edição (2009)				
T0 - <i>in situ</i>	1 (0,29%)	0 (0,00%)	1 (0,20%)	0,002 (p<0,05)
T1a - lâmina própria	38 (11,14%)	16 (9,64%)	54 (10,65%)	
T1b - submucosa	37 (10,85%)	17 (10,24%)	54 (10,65%)	
T2 - <i>muscularis propria</i>	39 (11,44%)	11 (6,63%)	50 (9,86%)	
T3 - subserosa	128 (37,54%)	42 (25,30%)	170 (33,53%)	
T4a - perfura a serosa	79 (23,17%)	68 (40,96%)	147 (28,99%)	
T4b - órgãos adjacentes	19 (5,57%)	12 (7,23%)	31 (6,11%)	
Total	341	166	507	
Metastização ganglionar (N)				
Presente	204 (59,30%)	130 (77,38%)	334 (65,23%)	<0,001 (p<0,05)
Ausente	140 (40,70%)	38 (22,62%)	178 (34,77%)	
Total	344	168	512	
TNM 7ª Edição (2009)				
N0 (0)	140 (41,06%)	38 (23,17%)	178 (35,25%)	<0,001 (p<0,05)
N1 (1-2)	80 (23,46%)	19 (11,59%)	99 (19,60%)	
N2 (3-6)	52 (15,25%)	25 (15,24%)	77 (15,25%)	
N3a (7-15)	52 (15,25%)	47 (28,66%)	99 (19,60%)	
N3b (>15)	17 (4,99%)	35 (21,34%)	52 (10,30%)	
Total	341	164	505	
Rácio (metastizados/ressecados)				
≤ 0,2	232 (68,84%)	68 (42,24%)	300 (60,24%)	<0,001 (p<0,05)
> 0,2	105 (31,16%)	93 (57,76%)	198 (39,76%)	
Total	337	161	498	
Classificação japonesa (topográfica)				
N0	140 (41,06%)	39 (23,64%)	179 (35,38%)	0,001 (p<0,05)
N1	135 (39,59%)	74 (44,85%)	209 (41,30%)	
N2	61 (17,89%)	48 (29,09%)	109 (21,54%)	
N3	5 (1,47%)	4 (2,42%)	9 (1,78%)	
Total	341	165	506	
Estadio				
TNM 7ª Edição (2009)				
O	1 (0,29%)	0 (0,00%)	1 (0,20%)	<0,001 (p<0,05)
IA	62 (18,29%)	22 (13,58%)	84 (16,77%)	
IB	34 (10,03%)	16 (9,88%)	50 (9,98%)	
IIA	45 (13,27%)	2 (1,23%)	47 (9,38%)	
IIB	49 (14,45%)	10 (6,17%)	59 (11,78%)	
IIIA	49 (14,45%)	16 (9,88%)	65 (12,97%)	
IIIB	46 (13,57%)	36 (22,22%)	82 (16,37%)	
IIIC	30 (8,85%)	38 (23,46%)	68 (13,57%)	
IV	23 (6,78%)	22 (13,58%)	45 (8,98%)	
Total	339	162	501	



ANÁLISE POR LOCALIZAÇÃO

Nesta fase do estudo, que consistiu na definição do perfil clínico-patológico e do estadiamento do carcinoma do estômago de acordo com a localização, foram analisados 957 casos com a seguinte distribuição: 232 carcinomas (24,24%) localizados na JEG, 236 (24,66%) no fundo e corpo, e 489 (51,1%) localizados no antro gástrico [dados não apresentados na íntegra].

Caracterização clínica

A Tabela 46 resume a caracterização clínica de acordo com a localização tumoral [apenas parâmetros com diferenças significativas].

Os tumores localizados na JEG apresentaram uma relação sexo masculino/feminino de 2,8 : 1, enquanto os carcinomas do fundo e do corpo apresentaram uma relação de 1,9 : 1 e os tumores do antro uma relação de 1,4 : 1.

A ressecabilidade foi aumentando à medida que avançamos no sentido distal em termos de localização tumoral (67,67% vs 73,31% vs 83,44%) assim como as ressecções do tipo R0 (65,43% vs 80,95% vs 84,07%).

Em relação ao tipo de linfadenectomia, foram realizadas linfadenectomias mais alargadas (D2 na classificação de Siewert e na classificação Japonesa) nos tumores proximais (fundo e corpo: 44,17% e 61,64%, respectivamente; JEG: 41,98% e 79,07%, respectivamente) em comparação com os tumores distais (antro: 26,43% e 44,12%, respectivamente).

Tabela 46. Resumo da caracterização clínica de acordo com a localização tumoral [apenas parâmetros com diferenças significativas]

Parâmetros	Localização			Total n (%)	Valor de p
	JEG n (%)	Fundo/Corpo n (%)	Antro n (%)		
Sexo					
Masculino	171 (73,71%)	155 (65,68%)	281 (57,46%)	607 (63,43%)	<0,001 (p<0,05)
Feminino	61 (26,29%)	81 (34,32%)	208 (42,54%)	350 (36,57%)	
Total	232	236	489	957	
Ressecabilidade					
Ressecável	157 (67,67%)	173 (73,31%)	408 (83,44%)	738 (77,12%)	<0,001 (p<0,05)
Irressecável	75 (32,33%)	63 (26,69%)	81 (16,56%)	219 (22,88%)	
Total	232	236	489	957	
Tipo de Ressecção					
R0	53 (65,43%)	102 (80,95%)	248 (84,07%)	403 (80,28%)	<0,001 (p<0,05)
R1	21 (25,93%)	11 (8,73%)	28 (9,49%)	60 (11,95%)	
R2	7 (8,64%)	13 (10,32%)	19 (6,44%)	39 (7,77%)	
Total	81	126	295	502	
Linfadenectomia					
Siewert					
D1 (≤25)	76 (58,02%)	91 (55,83%)	270 (73,57%)	437 (66,11%)	<0,001 (p<0,05)
D2 (>25)	55 (41,98%)	72 (44,17%)	97 (26,43%)	224 (33,89%)	
Total	131	163	367	661	
Japonesa					
D0	0 (0,00%)	1 (0,68%)	12 (3,53%)	13 (2,27%)	<0,001 (p<0,05)
D1	18 (20,93%)	55 (37,67%)	178 (52,35%)	251 (43,88%)	
D2	68 (79,07%)	90 (61,64%)	150 (44,12%)	308 (53,85%)	
Total	86	146	340	572	



Caracterização patológica

A Tabela 47 mostra os parâmetros da caracterização patológica de acordo com a localização tumoral em que se observaram diferenças significativas.

Os tumores distais apresentaram dimensões menores ($5,28 \pm 3,4$ cm) em comparação com os tumores mais proximais (JEG: $6,24 \pm 3,33$ cm; fundo e corpo: $6,5 \pm 3,58$ cm).

Em relação à forma macroscópica, a percentagem das formas vegetante e infiltrativa diminuiu à medida que avançamos no sentido distal em termos de localização tumoral (13,08% vs 11,18% vs 6,58% e 12,31% vs 9,94% vs 6,03%, respectivamente). Pelo contrário, a percentagem das formas ulcerada e ulcero-infiltrativa aumentou à medida que avançamos no sentido distal em termos de localização dos tumores (21,54% vs 26,71% vs 33,42% e 24,62% vs 31,68% vs 32,88%, respectivamente).

De acordo com a classificação de Laurén, os carcinomas do tipo difuso são menos frequentes na JEG (14,84%) em comparação com os tumores do fundo e corpo (24,69%), e com os tumores do antro (25,61%).

No que diz respeito à invasão venosa, à permeação linfática e à invasão perineural, a sua presença aumenta à medida que avançamos no sentido proximal em termos de localização tumoral (49,87% vs 62,42% vs 69,12%; 77,39% vs 81,71% vs 89,29% e 50,57% vs 51,28% vs 64,1%, respectivamente). A mesma tendência verifica-se na permeação linfática dos tumores sem metastização ganglionar (N0), mas sem significado estatístico ($p=0,531$).



Tabela 47. Resumo da caracterização patológica de acordo com a localização tumoral

Parâmetros	Localização			Total n (%)	Valor de p
	JEG n (%)	Fundo/Corpo n (%)	Antro n (%)		
Dimensões					
≤ 5 cm	55 (41,35%)	65 (40,37%)	212 (57,92%)	332 (50,30%)	<0,001 (p<0,05)
> 5 cm	78 (58,65%)	96 (59,63%)	154 (42,08%)	328 (49,70%)	
Total	133	161	366	660	
Forma macroscópica					
Vegetante	17 (13,08%)	18 (11,18%)	24 (6,58%)	59 (8,99%)	0,007 (p<0,05)
Ulcerada	28 (21,54%)	43 (26,71%)	122 (33,42%)	193 (29,42%)	
Infiltrativa	16 (12,31%)	16 (9,94%)	22 (6,03%)	54 (8,23%)	
Ulceró-vegetante	37 (28,46%)	33 (20,50%)	77 (21,10%)	147 (22,41%)	
Ulceró-infiltrativa	32 (24,62%)	51 (31,68%)	120 (32,88%)	203 (30,95%)	
Total	130	161	365	656	
Classificação de Laurén					
Intestinal	76 (59,38%)	78 (48,15%)	175 (47,17%)	329 (49,77%)	0,093 (p=ns)
Difuso	19 (14,84%)	40 (24,69%)	95 (25,61%)	154 (23,30%)	
Não classificável	33 (25,78%)	44 (27,16%)	101 (27,22%)	178 (26,93%)	
Total	128	162	371	661	
Invasão Venosa					
Presente	94 (69,12%)	103 (62,42%)	188 (49,87%)	385 (56,78%)	<0,001 (p<0,05)
Ausente	42 (30,88%)	62 (37,58%)	189 (50,13%)	293 (43,22%)	
Total	136	165	377	678	
Permeação Linfática					
Presente	125 (89,29%)	134 (81,71%)	291 (77,39%)	550 (80,88%)	0,009 (p<0,05)
Ausente	15 (10,71%)	30 (18,29%)	85 (22,61%)	130 (19,12%)	
Total	140	164	376	680	
Invasão Perineural					
Presente	50 (64,10%)	60 (51,28%)	133 (50,57%)	243 (53,06%)	0,099 (p=ns)
Ausente	28 (35,90%)	57 (48,72%)	130 (49,43%)	215 (46,94%)	
Total	78	117	263	458	

Estadiamento

A Tabela 48 documenta o estadiamento de acordo com a localização tumoral.

A percentagem de EGC vai diminuindo à medida que avançamos no sentido proximal em termos de localização tumoral (20,5% vs 11,59% vs 6,73%).

Os tumores mais proximais associaram-se a categorias mais avançadas em todos os parâmetros do estadiamento [progressão na parede (T), metastização ganglionar (N) e estadio] em comparação com os tumores mais distais.



Tabela 48. Estadiamento de acordo com a localização tumoral

Parâmetros	Localização			Total n (%)	Valor de p
	JEG n (%)	Fundo/Corpo n (%)	Antro n (%)		
Tipo de Carcinoma					
Early Gastric Cancer	15 (6,73%)	27 (11,59%)	98 (20,50%)	140 (14,99%)	<0,001 (p<0,05)
Avançado	208 (93,27%)	206 (88,41%)	380 (79,50%)	794 (85,01%)	
Total	223	233	478	934	
Classificação TNM					
Progressão na parede (T)					
TNM 7ª Edição (2009)					
T0 - <i>in situ</i>	3 (2,11%)	0 (0,00%)	2 (0,52%)	5 (0,72%)	<0,001 (p<0,05)
T1a - lâmina própria	4 (2,82%)	11 (6,55%)	39 (10,21%)	54 (7,80%)	
T1b - submucosa	7 (4,93%)	15 (8,93%)	50 (13,09%)	72 (10,40%)	
T2 - <i>muscularis propria</i>	12 (8,45%)	11 (6,55%)	39 (10,21%)	62 (8,96%)	
T3 - subserosa	37 (26,06%)	71 (42,26%)	137 (35,86%)	245 (35,40%)	
T4a - perfura a serosa	66 (46,48%)	51 (30,36%)	96 (25,13%)	213 (30,78%)	
T4b - órgãos adjacentes	13 (9,15%)	9 (5,36%)	19 (4,97%)	41 (5,92%)	
Total	142	168	382	692	
Metastização ganglionar (N)					
Presente	116 (78,91%)	118 (69,41%)	238 (60,10%)	472 (66,20%)	<0,001 (p<0,05)
Ausente	31 (21,09%)	52 (30,59%)	158 (39,90%)	241 (33,80%)	
Total	147	170	396	713	
TNM 7ª Edição (2009)					
N0 (0)	31 (21,83%)	52 (30,95%)	158 (40,83%)	241 (34,58%)	<0,001 (p<0,05)
N1 (1-2)	24 (16,90%)	34 (20,24%)	69 (17,83%)	127 (18,22%)	
N2 (3-6)	39 (27,46%)	17 (10,12%)	59 (15,25%)	115 (16,50%)	
N3a (7-15)	28 (19,72%)	41 (24,40%)	69 (17,83%)	138 (19,80%)	
N3b (>15)	20 (14,08%)	24 (14,29%)	32 (8,27%)	76 (10,90%)	
Total	142	168	387	697	
Rácio (metastizados/ressecados)					
≤ 0,2	68 (51,52%)	93 (57,06%)	234 (62,40%)	395 (58,96%)	0,078 (p=ns)
> 0,2	64 (48,48%)	70 (42,94%)	141 (37,60%)	275 (41,04%)	
Total	132	163	375	670	
Classificação japonesa (topográfica)					
N0	30 (21,28%)	52 (31,14%)	158 (40,72%)	240 (34,48%)	0,001 (p<0,05)
N1	71 (50,35%)	80 (47,90%)	143 (36,86%)	294 (42,24%)	
N2	38 (26,95%)	31 (18,56%)	82 (21,13%)	151 (21,70%)	
N3	2 (1,42%)	4 (2,40%)	5 (1,29%)	11 (1,58%)	
Total	141	167	388	696	
Estadio					
TNM 7ª Edição (2009)					
0	3 (2,17%)	0 (0,00%)	2 (0,52%)	5 (0,73%)	<0,001 (p<0,05)
IA	10 (7,25%)	19 (11,38%)	73 (19,06%)	102 (14,83%)	
IB	6 (4,35%)	11 (6,59%)	43 (11,23%)	60 (8,72%)	
IIA	9 (6,52%)	23 (13,77%)	44 (11,49%)	76 (11,05%)	
IIB	11 (7,97%)	21 (12,57%)	41 (10,70%)	73 (10,61%)	
IIIA	21 (15,22%)	16 (9,58%)	50 (13,05%)	87 (12,65%)	
IIIB	35 (25,36%)	31 (18,56%)	51 (13,32%)	117 (17,01%)	
IIIC	30 (21,74%)	28 (16,77%)	46 (12,01%)	104 (15,12%)	
IV	13 (9,42%)	18 (10,78%)	33 (8,62%)	64 (9,30%)	
Total	138	167	383	688	



Alterações da O-glicosilação das proteínas: Biomarcadores para diagnóstico precoce de carcinoma gástrico

A última parte do estudo consistiu na análise da imunoreactividade dos antígenos das formas imaturas de carboidratos das mucinas e antígenos de carboidratos do tipo Lewis, bem como na sua caracterização clínico-patológica e estadiamento, tendo sido analisados 36 dos 50 carcinomas do estômago e da JEG submetidos a cirurgia, entre Janeiro de 2009 e Outubro de 2009, no Serviço de Cirurgia Geral do Hospital São João EPE.

A Tabela 49 resume a imunoreactividade dos antígenos estudados de acordo com os diferentes intervalos da percentagem de expressão no tecido tumoral.

Em relação aos *antígenos de carboidratos simples das mucinas*, a imunoreactividade para o antígeno **Tn**, detectado pelo anticorpo monoclonal **1E3**, foi observada em todos os casos (100%). O antígeno **STn**, detectado pelo anticorpo monoclonal **TKH2**, foi observado em 94,4% dos casos, enquanto a sua detecção pelo anticorpo monoclonal **B72.3** ocorreu em 83,3% dos tumores. O antígeno **T**, detectado pelo anticorpo monoclonal **3C9**, estava presente em 19,4% dos casos e a sua forma sialilada, o antígeno **ST**, detectada pelo mesmo anticorpo, mas após tratamento com neuraminidase (**3C9/Neu**), foi observada em 55,6% dos tumores [Figura 35].

Relativamente aos *antígenos de carboidratos do tipo Lewis*, o antígeno **SLe^a**, detectado pelo anticorpo monoclonal **CA19-9**, foi observado em 77,8% dos tumores, enquanto o antígeno **SLe^x**, detectado pelo anticorpo monoclonal **KM93**, estava presente em 80,6% dos casos [Figura 35].

Tabela 49. Expressão dos antígenos estudados nos carcinomas gástricos

Antígenos (Anticorpos Monoclonais)	Estudo Imunohistoquímico					
	Negativo	Positivo				Total
		< 25%	25-50%	50-75%	> 75%	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Tn (1E3)	0 (0,00%)	9 (25,00%)	6 (16,67%)	10 (27,78%)	11 (30,56%)	36 (100,00%)
STn (TKH2)	2 (5,56%)	10 (27,78%)	11 (30,56%)	8 (22,22%)	5 (13,89%)	34 (94,44%)
STn (B72.3)	6 (16,67%)	11 (30,56%)	10 (27,78%)	7 (19,44%)	2 (5,56%)	30 (83,33%)
T (3C9)	29 (80,56%)	4 (11,11%)	2 (5,56%)	1 (2,78%)	0 (0,00%)	7 (19,44%)
ST (3C9/Neu)	16 (44,44%)	11 (30,56%)	5 (13,89%)	1 (2,78%)	3 (8,33%)	20 (55,56%)
SLe ^a (CA19.9)	8 (22,22%)	11 (30,56%)	3 (8,33%)	6 (16,67%)	8 (22,22%)	28 (77,78%)
SLe ^x (KM93)	7 (19,44%)	6 (16,67%)	7 (19,44%)	5 (13,89%)	11 (30,56%)	29 (80,56%)



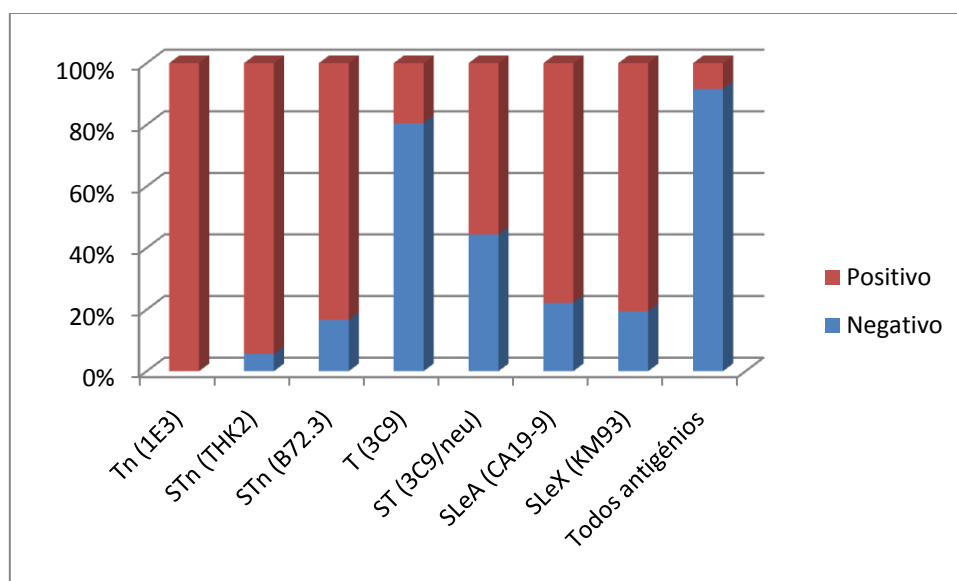


Figura 35. Representação gráfica da imunorreactividade dos antígenos estudados no tecido tumoral

Dos 36 carcinomas estudados, todos os casos apresentavam imunorreactividade pelo menos para 2 dos antígenos estudados. Assim, 2 casos (5,6%) apresentavam imunorreactividade para 2 antígenos, 4 casos (11,1%) para 3 antígenos, 3 casos (8,3%) para 4 antígenos, 9 casos (25%) para 5 antígenos, 15 casos (41,7%) para 6 antígenos e 3 casos (8,3%) para todos os 7 antígenos estudados [Figura 36].

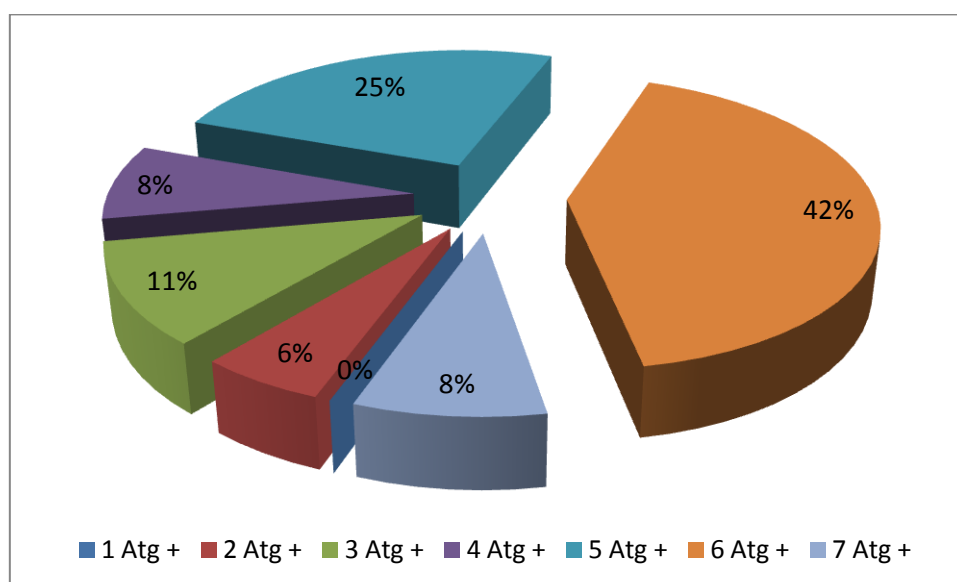


Figura 36. Representação gráfica do número de antígenos estudados (Atg) positivos por doente



A Tabela 50 mostra a correlação entre os diferentes antígenos estudados (avaliada dos mais frequentes para os menos frequentes).

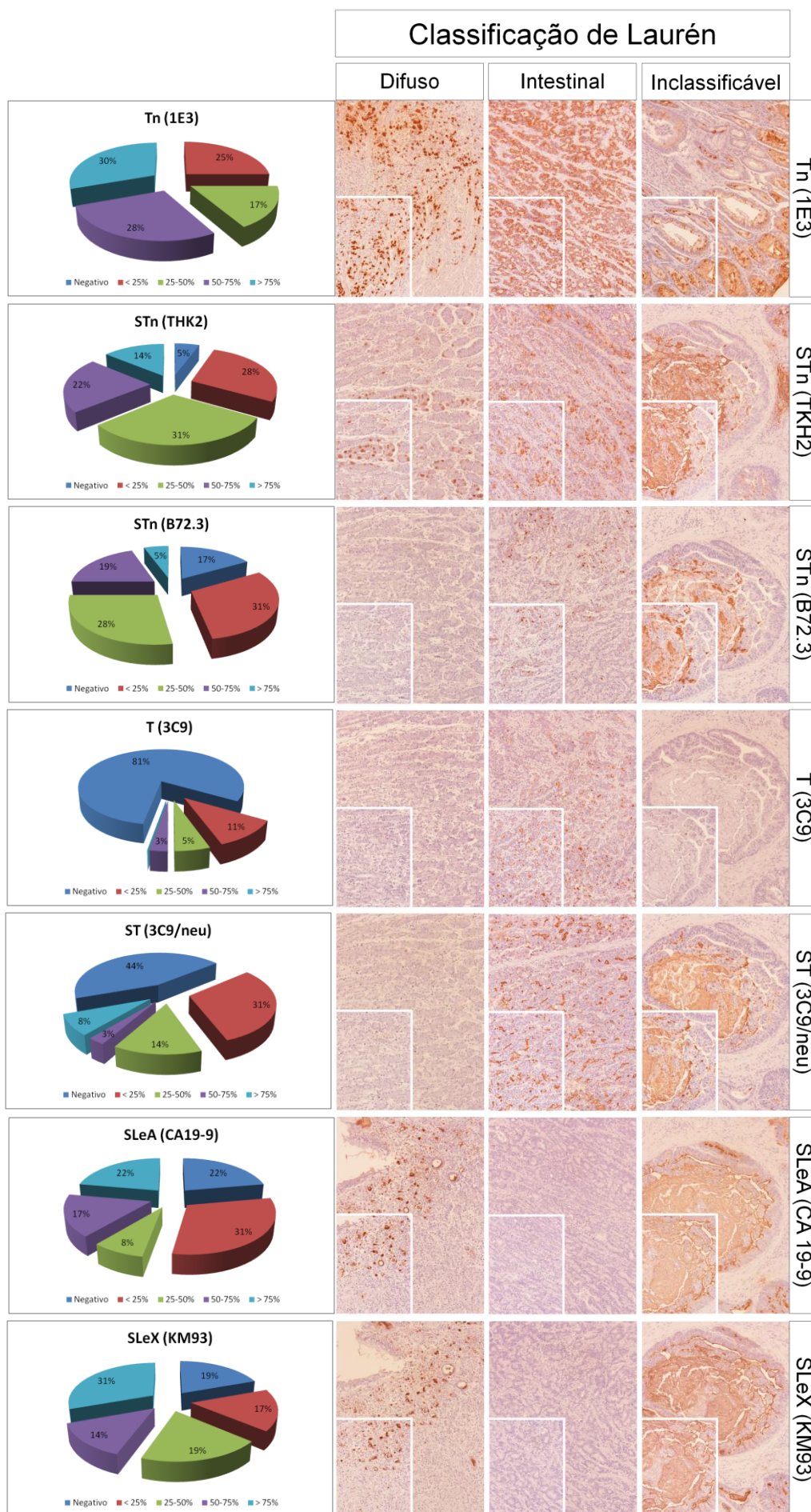
A correlação entre a detecção do antígeno STn pelo anticorpo TKH2 e pelo anticorpo B72.3 foi de 100%. A correlação entre a positividade da imunoreactividade para antígeno STn, detectada pelo anticorpo TKH2, e os outros antígenos estudados foi a seguinte: 96,6% com o antígeno SLe^x, 96,4% com o antígeno SLe^a, 100% com o antígeno ST e 71,4% com o antígeno T. Para o antígeno STn, detectado pelo anticorpo B72.3, a correlação com os outros antígenos foi a seguinte: 93,1% com o SLe^x, 92,9% com o SLe^a, 95% com o ST e 57,1% com o antígeno T. Relativamente ao antígeno SLe^x, os outros antígenos correlacionaram a sua positividade na imunohistoquímica do seguinte modo: 100% com o SLe^a, 90% com o ST e 71,4% com o antígeno T. Em relação ao antígeno SLe^a, a correlação foi a seguinte: 85% com o ST e 71,4% com o antígeno T. O antígeno ST teve uma correlação de 42,9% com o antígeno T.

Tabela 50. Correlação entre os antígenos estudados (em destaque a avaliação das correlações dos mais frequentes para os menos frequentes)

Antígenos	Tn (1E3) n = 36		STn (TKH2) n = 34		STn (B72.3) n = 30		SLe ^x (KM93) n = 29		SLe ^a (CA19.9) n = 28		ST (3C9/Neu) n = 20		T (3C9) n = 7	
Tn (1E3) n = 36			34/36	(94,4%)	30/36	(83,3%)	29/36	(80,6%)	28/36	(77,8%)	20/36	(55,6%)	7/36	(19,4%)
STn (TKH2) n = 34	34/34	(100%)			30/34	(88,2%)	28/34	(82,4%)	27/34	(79,4%)	20/34	(58,8%)	5/34	(14,7%)
STn (B72.3) n = 30	30/30	(100%)	30/30	(100%)			27/30	(90,0%)	26/30	(86,7%)	19/30	(63,3%)	4/30	(13,3%)
SLe ^x (KM93) n = 29	29/29	(100%)	28/29	(96,6%)	27/29	(93,1%)			28/29	(96,6%)	18/29	(62,1%)	5/29	(17,2%)
SLe ^a (CA19.9) n = 28	28/28	(100%)	27/28	(96,4%)	26/28	(92,9%)	28/28	(100%)			17/28	(60,7%)	5/28	(17,9%)
ST (3C9/Neu) n = 20	20/20	(100%)	20/20	(100%)	19/20	(95,0%)	18/20	(90,0%)	17/20	(85,0%)			3/20	(15,0%)
T (3C9) n = 7	7/7	(100%)	5/7	(71,4%)	4/7	(57,1%)	5/7	(71,4%)	5/7	(71,4%)	3/7	(42,9%)		

A figura seguinte mostra um exemplo da imunohistoquímica de cada um dos antígenos estudados, para cada um dos tipos de carcinoma segundo a classificação de Laurén, assim como a representação gráfica da expressão de cada um dos antígenos, de acordo com dos intervalos definidos (negativo, <25%, 25-50%, 50-75% e >75%).





Caracterização clínico-patológica

A Tabela 51 resume a caracterização clínico-patológica da população em que foi realizado o estudo imunohistoquímico dos antígenos em questão, no tecido tumoral.

Tabela 51. Caracterização clínico-patológica da população estudada

Parâmetros	População estudada	
	n	(%)
Idade		
≤ 45 anos	1	(2,8%)
> 45 anos	35	(97,2%)
Sexo		
Masculino	11	(30,6%)
Feminino	25	(69,4%)
Localização		
JEG	4	(11,1%)
Fundo/Corpo	6	(16,7%)
Antro	25	(69,4%)
Extensos	1	(2,8%)
Dimensões		
≤ 5 cm	17	(47,2%)
> 5 cm	19	(52,8%)
Forma macroscópica		
Vegetante	6	(17,1%)
Ulcerada	9	(25,7%)
Infiltrativa	0	(0,0%)
Ulceró-vegetante	5	(14,3%)
Ulceró-infiltrativa	15	(42,9%)
Classificação da OMS		
Tubular	22	(61,1%)
<i>Bem-moderadamente diferenciado</i>	19	(52,8%)
<i>Pouco diferenciado</i>	3	(8,3%)
Células isoladas em anel de sinete	2	(5,6%)
Mucinosos	2	(5,6%)
Adenoescamosos	0	(0,0%)
Medular rico em estroma linfóide	0	(0,0%)
Mistos	10	(27,8%)
Classificação de Laurén		
Intestinal	16	(44,4%)
Difuso	3	(8,3%)
Não classificável	17	(47,2%)
Classificação de Carneiro e colaboradores		
Glandular	16	(44,4%)
Misto	16	(44,4%)
Células isoladas	3	(8,3%)
Sólidos	1	(2,8%)
Classificação de Ming		
Expansivo	10	(27,8%)
Infiltrativo	25	(69,4%)
Não classificável	1	(2,8%)
Invasão Venosa		
Presente	14	(38,9%)
Ausente	22	(61,1%)
Permeação Linfática		
Presente	8	(22,2%)
Ausente	28	(77,8%)
Invasão Perineural		
Presente	20	(55,6%)
Ausente	16	(44,4%)



A caracterização clínico-patológica de acordo com a expressão dos antígenos no estudo imunohistoquímico encontra-se resumida na Tabela 52 [dados não apresentados na íntegra].

Relativamente ao **antígeno Tn**, foram encontradas diferenças significativas na invasão venosa ($p=0,023^1$ e $p=0,041^2$).

Em relação à invasão venosa, os tumores com a presença de invasão venosa apresentavam mais frequentemente (72,7%) uma expressão de Tn superior a 50% em comparação com os tumores sem invasão venosa (35,7%).

A invasão perineural mostrou uma tendência idêntica à da invasão venosa, no entanto, sem significado estatístico ($p=0,096$). Os carcinomas com invasão perineural associaram-se mais vezes (75%) a uma expressão superior a 50% de Tn em comparação com os tumores sem invasão perineural (45%).

A caracterização clínico-patológica de acordo com a expressão do **antígeno STn**, detectada pelo anticorpo **TKH2** na imunohistoquímica, apresentou diferenças significativas na localização tumoral ($p=0,001$).

Todos os tumores da JEG apresentaram imunorreactividade para o antígeno STn (TKH2), assim como todos tumores do fundo e do corpo. Os tumores com imunorreactividade para o antígeno STn (TKH2) foram mais frequentes no antro (70,6%) do que os carcinomas sem expressão de antígeno STn (50%). A mesma tendência foi observada na análise da localização de acordo com os diferentes intervalos da percentagem de expressão ($p=0,034$).

A imunorreactividade do **antígeno STn**, detectado pelo anticorpo **B72.3**, apresentou diferenças significativas nos seguintes parâmetros: localização tumoral ($p=0,006$), forma macroscópica ($p=0,005^+$ e $p=0,016^+$).

Os casos com expressão de STn, detectada através do anticorpo B72.3, foram mais frequentes no antro (73,3%) e na JEG (13,3%) em comparação com os tumores sem expressão de STn (50% e 0%, respectivamente). Por outro lado, os tumores com expressão de STn (B72.3) foram menos frequentes (13,3%) no fundo e corpo do que os carcinomas sem expressão do antígeno (33,3%).

Em relação à forma macroscópica, os tumores com uma expressão superior a 50% de STn (B72.3) foram classificados como vegetantes (50%) e ulcero-vegetantes (25%) numa percentagem superior em comparação com os carcinomas com menos de 50% de expressão do antígeno (7,4% e 11,1%, respectivamente). Por outro lado, os carcinomas com expressão inferior a 50% de STn (B72.3) eram ulcerados (29,6%) e ulcero-infiltrativos (51,9%) numa percentagem superior comparativamente com os tumores com mais de 50% de expressão (12,5% em ambos os casos). As mesmas diferenças foram observadas na distribuição dos casos pelos diferentes intervalos da percentagem de expressão do antígeno STn (B72.3)

¹ Comparação entre os intervalos da percentagem de expressão (Negativo, <25%, 25-50%, 50-75%, >75%)

² Comparação entre <50% e >50% de expressão



relativamente à forma macroscópica. Na comparação entre a presença e ausência da expressão deste antígeno, também se observaram diferenças, mas sem significado estatístico ($p=0,075$).

A caracterização clínico-patológica de acordo com a expressão do **antígeno T**, detectada pelo anticorpo 3C9 na imunohistoquímica, apresentou diferenças significativas na idade ($p=0,015$).

Os tumores com expressão do antígeno T apresentavam uma idade média ($70,17 \pm 11,76$ anos) superior em comparação com os carcinomas sem expressão do mesmo antígeno ($68,38 \pm 11,89$ anos). A mesma tendência foi observada na distribuição dos casos pelas diferentes percentagens de expressão do antígeno T, mas sem significado estatístico ($p=0,066$).

Todos os doentes com expressão do antígeno T eram do sexo feminino. Nos tumores sem expressão deste antígeno observou-se um predomínio também do sexo feminino (62,1%). Apesar desta tendência, não se observou significado estatístico ($p=0,051$).

Os carcinomas com expressão do antígeno T foram mais frequentes no antro (85,7%) em comparação com os tumores sem expressão (65,5%), no entanto, esta diferença não teve significado estatístico ($p=0,076$). Todos os tumores da JEG e do fundo e corpo não apresentavam expressão de antígeno T.

Em termos de dimensões do tumor, os casos com expressão do antígeno T apresentavam dimensões superiores ($6,69 \pm 1,43$ cm) em comparação com os tumores sem expressão do antígeno ($5,9 \pm 3,47$ cm), no entanto, esta diferença não teve significado estatístico ($p=0,052$).

Observaram-se diferenças significativas na distribuição dos casos de acordo com a expressão do **antígeno ST**, detectado pelo anticorpo 3C9 após tratamento com neuraminidase, na classificação da OMS ($p=0,002^+$ e $p=0,021^+$).

Em relação à forma macroscópica, os tumores com expressão de ST foram classificados como vegetantes e ulcero-vegetantes numa percentagem superior (31,6% e 15,8%) comparativamente com os carcinomas sem expressão deste antígeno (0% e 12,5%, respectivamente). Por outro lado, os carcinomas com expressão de ST foram menos vezes classificados como ulcerados (15,8%) e ulcero-infiltrativos (15,8%) em comparação com os tumores sem expressão de ST (37,5% e 50%, respectivamente). No entanto, estas diferenças não foram estatisticamente significativas ($p=0,07$).

De acordo com a classificação da OMS, os tumores com mais de 50% de expressão de ST foram menos vezes (25%) tubulares do que os carcinomas sem expressão deste antígeno (65,6%).

Relativamente ao antígeno **SLe^a**, detectado pelo anticorpo CA19-9, não se observaram diferenças significativas na distribuição dos casos pelos diferentes parâmetros clínico-patológicos. Os tumores com mais de 50% de expressão deste antígeno apresentavam



dimensões menores ($4,84 \pm 2,77$ cm) do que os carcinomas com menos de 50% de expressão ($6,82 \pm 3,24$ cm), no entanto, estas diferenças não foram estatisticamente significativas ($p=0,067$).

A caracterização clínico-patológica de acordo com a expressão do antígeno **SLe^x**, apresentou diferenças significativas apenas nas dimensões do tumor ($p=0,021$).

Os tumores com mais de 50% de expressão de SLe^x apresentavam dimensões menores ($4,68 \pm 2,67$ cm) do que os carcinomas com menos de 50% de expressão do antígeno ($7,16 \pm 3,17$ cm).

Tabela 52. Resumo da caracterização clínico-patológica de acordo com a expressão dos antígenos no estudo imunohistoquímico

Parâmetros	Antígenos (Anticorpo Monoclonal)						
	Tn (1E3)	STn (TKH2)	STn (B72.3)	T (3C9)	ST (3C9/neu)	SLe ^a (CA19.9)	SLe ^x (KM93)
Idade [§]	$p=ns$	$p=ns$	$p=ns$	0,015* $0,066†$	$p=ns$	$p=ns$	$p=ns$
Sexo	$p=ns$	$p=ns$	$p=ns$	$0,051*$	$p=ns$	$p=ns$	$p=ns$
Localização	$p=ns$	0,001* $0,034†$	0,06*	$0,076*$	$p=ns$	$p=ns$	$p=ns$
Dimensões	$p=ns$	$p=ns$	$p=ns$	$0,052*$	$p=ns$	$0,067‡$	0,021‡
Forma macroscópica	$p=ns$	$p=ns$	0,005† 0,016‡ $0,075*$	$p=ns$	$0,07*$	$p=ns$	$p=ns$
Classificação da OMS	$p=ns$	$p=ns$	$p=ns$	$p=ns$	0,002‡ 0,021†	$p=ns$	$p=ns$
Classificação de Laurén	$p=ns$	$p=ns$	$p=ns$	$p=ns$	$p=ns$	$p=ns$	$p=ns$
Classificação de Carneiro e colaboradores	$p=ns$	$p=ns$	$p=ns$	$p=ns$	$p=ns$	$p=ns$	$p=ns$
Classificação de Ming	$p=ns$	$p=ns$	$p=ns$	$p=ns$	$p=ns$	$p=ns$	$p=ns$
Invasão venosa	0,023† 0,041‡	$p=ns$	$p=ns$	$p=ns$	$p=ns$	$p=ns$	$p=ns$
Permeação linfática	$p=ns$	$p=ns$	$p=ns$	$p=ns$	$p=ns$	$p=ns$	$p=ns$
Invasão perineural	$0,096‡$	$p=ns$	$p=ns$	$p=ns$	$p=ns$	$p=ns$	$p=ns$

[§] Teste de Mann-Whitney na comparação entre presença e ausência e entre <50% e >50% de expressão;

Teste de Kruskal-Wallis na comparação entre intervalos de % de expressão

* Comparação entre a presença e a ausência de expressão

† Comparação entre os intervalos da % de expressão (Negativo, <25%, 25-50%, 50-75%, >75%)

‡ Comparação entre <50% e >50% de expressão



Estadiamento

A Tabela 53 documenta o estadiamento dos tumores em que foi realizado o estudo imunohistoquímico das formas imaturas de carboidratos das mucinas e dos antígenos do tipo Lewis.

Tabela 53. Estadiamento dos tumores da população estudada

Parâmetros	População estudada n (%)
Tipo de Carcinoma	
Early Gastric Cancer	6 (16,7%)
Avançado	30 (83,3%)
Classificação TNM	
Progressão na parede (T)	
<i>TNM 7ª Edição (2009)</i>	
T0 - <i>in situ</i>	0 (0,0%)
T1a - lâmina própria	1 (2,8%)
T1b - submucosa	5 (13,9%)
T2 - <i>muscularis propria</i>	4 (11,1%)
T3 - subserosa	17 (47,2%)
T4a - perfura a serosa	7 (19,4%)
T4b - órgãos adjacentes	2 (5,6%)
<i>Invasão da serosa</i>	
Não	27 (75,0%)
Sim	9 (25,0%)
Metastização ganglionar (N)	
Presente	17 (47,2%)
Ausente	19 (52,8%)
<i>TNM 7ª Edição (2009)</i>	
N0 (0)	16 (44,4%)
N1 (1-2)	5 (13,9%)
N2 (3-6)	8 (22,2%)
N3a (7-15)	4 (11,1%)
N3b (>15)	3 (8,3%)
<i>Rácio (metastizados/ressecados)</i>	
≤ 0,2	27 (75,0%)
> 0,2	9 (25,0%)
Estadio	
<i>TNM 7ª Edição (2009)</i>	
0	1 (2,8%)
IA	2 (5,6%)
IB	5 (13,9%)
IIA	10 (27,8%)
IIB	2 (5,6%)
IIIA	6 (16,7%)
IIIB	5 (13,9%)
IIIC	2 (5,6%)
IV	3 (8,3%)

Relativamente ao estadiamento (Tabela 54), a expressão do **antígeno Tn**, detectada pelo anticorpo 1E3, apresentou diferenças significativas nos seguintes parâmetros: tipo de



carcinoma ($p=0,023^{\dagger}$), invasão da serosa ($p=0,032^{\dagger}$), rácio ganglionar ($p=0,032^{\dagger}$) e estadió ($p=0,035^{\dagger}$).

Os tumores com mais de 50% de expressão de Tn eram tumores avançados numa percentagem superior (95,2%) em comparação com os carcinomas com menos de 50% de expressão do antígeno (66,7%). A mesma tendência, mas sem significado estatístico ($p=0,059$), foi observada na distribuição dos casos de acordo com as diferentes percentagens de expressão.

Os tumores com expressão superior a 50% de Tn apresentaram uma tendência ($p=0,088$) para categorias mais avançadas no que diz respeito à progressão do tumor na parede. Relativamente à invasão da serosa, os casos com mais de 50% de expressão invadiram mais vezes (38,1%) a serosa do que os tumores com menos de 50% de expressão (6,7%).

Em relação metastização ganglionar, os carcinomas com expressão superior a 50% de Tn apresentaram mais frequentemente (38,1%) rácios ganglionares superiores a 0,2, do que os tumores com expressão inferior a 50% (6,7%). A mesma tendência, mas sem significado estatístico ($p=0,098$), foi observada na distribuição dos casos de acordo com as diferentes percentagens de expressão.

Relativamente ao estadió (7ª Edição da TNM), os tumores com expressão superior a 50% de Tn associaram-se a categorias mais avançadas do que os tumores com menos de 50% de expressão.

O estadiamento de acordo com a expressão do **antígeno STn**, detectado pelo anticorpo **TKH2**, apresentou diferenças significativas apenas no rácio ganglionar ($p=0,012$). Assim 77,85% dos tumores com rácios ganglionares superiores a 0,2 apresentaram expressão deste antígeno.

O estadiamento de acordo com a expressão dos **antígenos STn** (detectado pelo anticorpo **B72.3**), o **antígeno T** (detectado pelo anticorpo 3C9) e o **antígeno ST** (detectado pelo anticorpo 3C9 após tratamento com neuraminidase) não apresentaram diferenças significativas.

Os parâmetros relativos ao estadiamento em que se observaram diferenças significativas, de acordo com a expressão de **SLe^a**, detectada pelo anticorpo CA19-9, foram os seguintes: progressão na parede ($p=0,001^{\dagger}$ e $p=0,003^{\dagger}$), invasão da serosa ($p=0,048^{\dagger}$), metastização ganglionar ($p=0,019^{\dagger}$).

Relativamente à progressão do tumor na parede (7ª Edição da TNM), os tumores com expressão superior a 50% de Tn associaram-se a categorias mais avançadas do que os tumores com menos de 50% de expressão. A mesma tendência foi observada na distribuição dos casos de acordo com as diferentes percentagens de expressão.

Em relação à invasão da serosa, os casos com mais de 50% de expressão invadiram mais vezes (42,9%) a serosa do que os tumores com menos de 50% de expressão (13,6%).



De acordo com a metastização ganglionar (7ª Edição da classificação TNM), a distribuição dos casos pelos intervalos da percentagem de expressão apresentou diferenças significativas, com uma tendência para as categorias mais avançadas nos tumores com expressão de SLe^a.

O estadiamento de acordo com a expressão do antígeno **SLe^x**, detectado pelo anticorpo KM93, apresentou diferenças significativas apenas na progressão do tumor na parede ($p=0,014^\ddagger$ e $p=0,024^\ddagger$).

Os tumores com expressão superior a 50% de SLe^x associaram-se a categorias mais avançadas na progressão na parede (T da 7ª Edição da classificação TNM) do que os tumores com menos de 50% de expressão. A mesma tendência foi observada na distribuição dos casos de acordo com as diferentes percentagens de expressão.

Relativamente à metastização ganglionar, observou-se uma tendência, mas sem significado estatístico ($p=0,083$) para a presença de metástases ganglionares na distribuição dos casos de acordo com os diferentes intervalos da percentagem de expressão.

Em relação ao estadio, os tumores com expressão superior a 50% de SLe^x associaram-se a uma tendência ($p=0,085$) para categorias mais avançadas do que os tumores com menos de 50% de expressão.

Tabela 54. Resumo do estadiamento de acordo com a expressão dos antígenos no estudo imunohistoquímico

Parâmetros	Antígenos (Anticorpo Monoclonal)						
	Tn (1E3)	STn (TKH2)	STn (B72.3)	T (3C9)	ST (3C9/neu)	SLe ^a (CA19.9)	SLe ^x (KM93)
Tipo de Carcinoma	0,023[‡] <i>0,059[†]</i>	<i>p=ns</i>	<i>p=ns</i>	<i>p=ns</i>	<i>p=ns</i>	<i>0,089[†]</i>	<i>p=ns</i>
Classificação TNM							
<i>Progressão na parede (T)</i>							
TNM 7ª Edição (2009)	<i>0,088[‡]</i>	<i>p=ns</i>	<i>p=ns</i>	<i>p=ns</i>	<i>p=ns</i>	0,001[†] 0,003[‡]	0,014[‡] 0,024[†]
Invasão da Serosa	0,032[‡]	<i>p=ns</i>	<i>p=ns</i>	<i>p=ns</i>	<i>p=ns</i>	0,048[‡]	<i>p=ns</i>
<i>Metastização ganglionar (N)</i>							
Metastização ganglionar	<i>p=ns</i>	<i>p=ns</i>	<i>p=ns</i>	<i>p=ns</i>	<i>p=ns</i>	<i>p=ns</i>	<i>0,083[†]</i>
TNM 7ª Edição (2009)	<i>p=ns</i>	<i>p=ns</i>	<i>p=ns</i>	<i>p=ns</i>	<i>p=ns</i>	0,019[†]	<i>p=ns</i>
Rácio ganglionar	0,032[‡] <i>0,098[†]</i>	0,012[*]	<i>p=ns</i>	<i>p=ns</i>	<i>p=ns</i>	<i>p=ns</i>	<i>p=ns</i>
<i>Estadio</i>							
TNM 7ª Edição (2009)	0,035[‡]	<i>p=ns</i>	<i>p=ns</i>	<i>p=ns</i>	<i>p=ns</i>	<i>p=ns</i>	<i>0,085[‡]</i>

* Comparação entre a presença e a ausência de expressão

† Comparação entre os intervalos da % de expressão (Negativo, <25%, 25-50%, 50-75%, >75%)

‡ Comparação entre <50% e >50% de expressão



DISCUSSÃO

Caracterização clínico-patológica e prognóstica do carcinoma gástrico: A evolução da nossa realidade

A análise dos dados da primeira etapa do estudo procurou contribuir para o melhor conhecimento da nossa realidade actual assim como da evolução nos últimos anos do carcinoma gástrico, com a clarificação do perfil clínico-patológico e dos factores de prognóstico.

Na população estudada observou-se um predomínio do sexo masculino (63,84%), com uma relação sexo masculino/feminino de 1,8 : 1. Estes dados estão de acordo com o descrito na literatura (Siewert, Bottcher et al. 1998; Maehara, Kakeji et al. 2000; Lochhead and El-Omar 2008) e com os estudos prévios do nosso grupo [441-443].

Segundo a literatura, o pico de incidência do cancro gástrico ocorre na sétima década de vida [444-445]. Neste estudo, a idade média de diagnóstico foi de 64,4 anos, tendo apresentado uma tendência para o seu aumento ao longo dos períodos estudados. A sobrevida dos doentes mais velhos melhorou ao longo do tempo, pelo que as diferenças verificadas na sobrevida entre idosos e jovens foram atenuadas.

No entanto, registaram-se em alguns casos de carcinoma gástrico em doentes mais jovens – EOGC, apesar de se ter observado uma diminuição da sua incidência ao longo do tempo. A taxa de EOGC da nossa série (10,59%) está de acordo com o classicamente descrito na literatura [446-447], embora as taxas possam variar entre 2,7% [448] e 15% [449] segundo alguns estudos. No entanto, esta taxa diminuiu ao longo dos períodos (8,1% no último período). Não se verificou a preponderância para sexo feminino neste subgrupo de doentes como está descrito na literatura [*dados não mostrados*] [448, 450].

Os indivíduos mais jovens apresentaram tumores com dimensões menores ($4,89 \pm 2,7$ cm), facto este que, tanto quanto é do nosso conhecimento, ainda não tinha sido descrito.

Neste estudo, os doentes com EOGC foram submetidos a cirurgias de ressecção mais extensas (mais gastrectomias totais (69,7%) do que subtotais distais (30,3%)) com linfadenectomias também mais alargadas (D2 em 71,93%). Este subgrupo de doentes apresentou uma percentagem muito superior (55,41%) de tumores do tipo difuso segundo a classificação de Laurén, o que está de acordo com o descrito na literatura, [448, 450-451] e de tumores infiltrativos (88,57%) segundo a classificação de Ming, em comparação com os doentes mais velhos (20,16% e 68,31%, respectivamente), o que poderá contribuir para explicar a taxa mais elevada de gastrectomias totais nestes doentes. Por outro lado, esta agressividade cirúrgica estará relacionada com o melhor estado fisiológico destes doentes, que apresentam menos comorbilidades, o que pode permitir ao cirurgião ser mais radical na sua abordagem. Assim, apesar dos tumores neste grupo de doentes terem apresentado com maior frequência características patológicas classicamente associadas a pior prognóstico (os subtipos das classificações histológicas e da classificação de Ming previamente referidos) os EOGC nesta série apresentaram sobrevidas superiores (44% vs 31% aos 5 anos), ao contrário do que está descrito em alguns estudos [452]. Em estudos do nosso grupo já tinha sido observada esta



tendência para sobrevidas superiores dos EOGC [453]. Outros factores de prognóstico, como a invasão venosa e a permeação linfática, foram menos frequentes no grupo dos EOGC.

Não se verificaram diferenças relativamente ao estadiamento entre os doentes jovens e os indivíduos mais velhos, o que está de acordo com alguns estudos da literatura [446, 449, 454] que referem não existir diferenças entre estes dois grupos quer no estadiamento, quer nos factores de prognóstico e que as diferenças na sobrevida observadas nos diferentes estudos, dependem do facto dos doentes serem submetidos ou não a cirurgia de ressecção com intenção curativa.

A divisão da localização dos tumores em JEG, fundo/corpo e antro está de acordo com a metodologia utilizada por Pinto de Sousa e colaboradores [18]. Esse estudo mostrou a influência da localização tumoral no comportamento biológico dos carcinomas gástricos. Os tumores mais proximais (JEG) e carcinomas distais (antro) são entidades distintas, pois apresentam diferenças nos perfis clínico-patológicos assim como no prognóstico, enquanto os tumores do fundo e do corpo partilham algumas afinidades com ambos. Também o carcinoma do coto gástrico apresenta características que permitem diferenciá-lo dos outros carcinomas gástricos [455].

Apesar da já conhecida migração proximal do cancro do estômago [180, 264], nesta série verificou-se um predomínio dos tumores distais (51,1% de carcinomas no antro gástrico) e a incidência dos tumores proximais manteve-se estável ao longo dos três períodos estudados. Estes dados poderão sugerir que em Portugal ainda são muito frequentes as deficientes condições sócio-económicas que favorecem o desenvolvimento do carcinoma do antro. Estas observações estão de acordo com as que indicam uma maior frequência de carcinomas gástricos distais nos países com elevada incidência de carcinomas do estômago [17, 152].

Em termos de sobrevida, os tumores do fundo e do corpo apresentaram curvas de sobrevida cumulativa inferiores relativamente às outras localizações; no entanto, estas diferenças foram diminuindo ao longo do tempo, pelo que no terceiro período estes tumores já apresentavam curvas de sobrevida idênticas às das outras localizações. É de realçar que nesta série os tumores da JEG e os do fundo/corpo associaram-se a curvas de sobrevida inferiores em comparação com os carcinomas distais. Esta associação a um pior prognóstico é descrita na literatura como estando essencialmente dependente do estadio dos carcinomas [456-457]. No nosso estudo os tumores da JEG associaram-se a categorias mais avançadas em todos os parâmetros do estadiamento [progressão na parede (T), metastização ganglionar (N) e estadio] em comparação com os tumores mais distais. É possível que a extensão da linfadenectomia realizada nos casos de carcinomas da JEG possa ter contribuído para atenuar um pouco estas diferenças encontradas na sobrevida dos doentes. Por outro lado, a incidência de tumores do tipo difuso de Laurén, que estão associados a pior prognóstico, foi menor nesta localização, o que está de acordo com os estudos prévios no nosso grupo [18] e de outros autores [457].

Os tumores da JEG apresentaram uma relação sexo masculino/feminino superior à registada nos tumores mais distais. Esta observação é coincidente com os dados relatados nos estudos prévios do nosso grupo [18] e de outros autores [457-458], e reforça a convicção de que os



doentes do sexo masculino estão mais expostos aos factores exógenos da carcinogénese dos tumores da JEG, tais como o álcool e o tabaco [459].

Verificou-se que os tumores mais proximais (JEG e fundo/corpo) apresentaram dimensões maiores do que os carcinomas do antro. Esta observação está de acordo com estudos prévios do nosso grupo [18] e de outros autores [460-461]. O crescimento dos tumores da JEG para a parte proximal do estômago ou o desenvolvimento inicial destes tumores no fundo gástrico (região com maiores dimensões e distensibilidade) e a invasão ulterior do cárdia têm sido apontados como hipóteses explicativas desta observação [18].

Em relação à forma macroscópica, a frequência de tumores vegetantes e infiltrativos diminuiu à medida que avançamos no sentido distal ao longo do estômago, enquanto a percentagem de carcinomas ulcerados e ulcero-infiltrativos diminuiu no sentido oposto. Este achado não parece estar relacionado com as características histopatológicas dos tumores, embora já tenha sido descrito num estudo prévio do nosso grupo [18].

A incidência de EGC foi diminuindo à medida que avançamos no sentido proximal ao longo do estômago, pelo que a ressecabilidade e as ressecções do tipo R0 acompanharam esta tendência. Para explicar a maior progressão na parede nos tumores proximais tem sido apontado o facto da ausência de serosa na face posterior da JEG e fundo gástrico o que facilita a progressão dos tumores nestas localizações [18, 457, 461].

No que diz respeito à invasão venosa, à permeação linfática e à invasão perineural, a sua frequência aumentou à medida que avançamos no sentido proximal ao longo do estômago, tendo-se verificado a mesma tendência na permeação linfática dos tumores sem metastização ganglionar (N0). A metastização ganglionar também acompanhou esta tendência. Estes achados estão de acordo com estudo prévios do nosso grupo [18] e de outros autores [457, 460-462].

Assim o efeito cumulativo do potencial agressivo dos factores anteriormente descritos reflectiu-se na presença de estadios mais avançados nos carcinomas da JEG.

Em relação à idade dos doentes não se registaram diferenças significativas de acordo com a localização [*dados não apresentados*]. Esta observação, que já tinha sido verificada num estudo prévio do nosso grupo [18], não é concordante com outros estudos [457] que indicam que os doentes com tumores proximais (JEG e fundo/corpo) são mais jovens do que os doentes com carcinomas distais.

O diagnóstico do carcinoma do estômago em fases tardias da sua história natural, a idade avançada dos doentes e a coexistência de patologia grave são factores que conduzem, entre nós, a taxas de inoperabilidade elevadas. No entanto, neste estudo a taxa de inoperabilidade (14,8%) foi inferior em comparação com os estudos prévios do nosso grupo (20,2%) [441] e com outros estudos nacionais [463-465]. A tendência para diminuição desta taxa verificou-se ao longo do tempo, tendo diminuído de 17,86% para 13,49%, entre o primeiro e o último período.



O recurso a exames complementares de diagnóstico com elevada acuidade no estadiamento do carcinoma gástrico tem possibilitado o conhecimento antecipado da irresssecabilidade ou da disseminação sistémica da doença neoplásica e, deste modo, muitos doentes poderão ser poupados à desnecessária laparotomia exploradora [466-470]; no entanto, 19,1% dos doentes ainda foram submetidos a cirurgia de não ressecção, embora se tenha registado uma ligeira melhoria desta percentagem no último período estudado (18,1%).

A taxa de ressecabilidade nesta série foi de 66,12%, sendo superior à de estudos prévios do nosso grupo (58,2%) [441]. Para este aumento desta taxa muito terá contribuído o acumular de experiência dos cirurgiões devido à sectorização por áreas de patologia cirúrgica existente no Serviço de Cirurgia Geral. A experiência adquirida, aliada a outros factores seguramente não menos importantes, terá permitido que o cirurgião adoptasse uma atitude mais intervencionista e conseguisse ressecar mais frequentemente os carcinomas do estômago. Assim, observou-se um aumento da taxa de ressecabilidade ao longo do tempo (de 62,46% no primeiro período para 68,63% no último período), principalmente devido ao aumento da cirurgia de ressecção gástrica (passou de 73,96% para 83,45%), uma vez que a taxa de cirurgia de ressecção dos tumores da JEG, que já era relativamente elevada (84,18%), permaneceu estável ao longo do tempo. No entanto, esta taxa ainda foi inferior à de outros estudos europeus com um elevado número de doentes (*German Gastric Cancer Study*, GGCS) em que se verificou uma taxa de ressecabilidade de 82,7% [180]. A ressecabilidade dos tumores influenciou de forma significativa as curvas de sobrevida cumulativa dos doentes, sendo o dobro nos carcinomas ressecáveis em comparação com os irresssecáveis (41% vs 20% aos 5 anos, respectivamente).

Neste estudo, observou-se uma opção crescente pela gastrectomia total (de 36,62% para 51,79%, entre o primeiro e último períodos) para tratamento dos doentes com carcinoma do estômago. Esta tendência já tinha sido constatada em estudos prévios do nosso grupo [441, 471]. Segundo um estudo randomizado multicêntrico do *Italian Gastrointestinal Tumor Study Group* (IGTSG) [472], a gastrectomia subtotal distal, no caso dos tumores do antro gástrico, deverá ser a opção cirúrgica escolhida desde que garanta uma margem de segurança proximal adequada, uma vez que não se verificaram diferenças na sobrevida entre a gastrectomia total e a subtotal distal e a última associou-se a um melhor estado nutricional bem como uma melhor qualidade de vida. Na nossa série, esta tendência para a realização de gastrectomia total provavelmente relacionou-se com a incidência de tumores com células isoladas em anel de sinete (30,14%) segundo a classificação da OMS ou de tumores difusos (23,97%) segundo a classificação de Laurén (61,69% dos quais localizados no antro) e a preocupação na obtenção de uma margem de segurança adequada e de uma ressecção do tipo R0.

Em relação à radicalidade da cirurgia de ressecção, na maioria dos casos (53,87%) foram realizadas linfadenectomias alargadas (do tipo D2 da classificação Japonesa) associadas a uma elevada percentagem (79,96%) de ressecções completas do tumor (do tipo R0). Na maioria dos doentes (67,8%) foi ressecado o número mínimo de gânglios (15) para um correcto estadiamento [175-176]. Na análise destes parâmetros, de acordo com os diferentes períodos, registou-se um aumento quer das linfadenectomias alargadas (45,64% e 63,4% de linfadenectomias do tipo D2 segundo a classificação de Siewert e a classificação Japonesa, respectivamente, no último período), quer das ressecções R0 (84,76% no último período).



Apesar da frequência de linfadenectomia do tipo D2 ser inferior ao descrito na literatura nos países do Oriente [219], a percentagem de ressecções R0 é bastante superior à de outros estudos com grandes séries de doentes (71,5% no GGCS) [180].

O tipo de linfadenectomia e de ressecção influenciou as curvas cumulativas de sobrevida dos doentes, uma vez que as linfadenectomias mais alargadas (D2) e as ressecções do tipo R0 se associaram a sobrevidas maiores (46% vs 31% aos 5 anos e 57% vs 26 a 15% aos 5 anos, respectivamente).

Tendo em consideração a possibilidade do aumento da taxa de complicações relacionada com a realização de cirurgias mais radicais, o nosso grupo tem preocupação constante em monitorizar tais complicações. Assim, num trabalho recentemente apresentado [473], a avaliação das complicações associadas à cirurgia de ressecção gástrica por carcinoma mostrou que a taxa de complicações na nossa série não parece ter sido significativamente influenciada pelo tipo de cirurgia realizada.

Em relação às dimensões dos tumores, foi registada uma média de $5,86 \pm 3,7$ cm, o que é concordante com os valores observados em outros estudos com grandes séries [180, 219]. No nosso estudo, os tumores com maiores dimensões associaram-se a sobrevidas inferiores (44% vs 31%). Os estudos relativos ao efeito do tamanho do tumor na sobrevida são contraditórios [194], havendo referências a que o volume dos tumores teria maior significado prognóstico [199].

No que diz respeito à forma macroscópica, a maioria dos tumores foram classificados como sendo do tipo ulcero-infiltrativo, ulcerado ou ulcero-vegetante. A percentagem de tumores infiltrativos foi relativamente baixa (8,88%), apesar disso, esta distribuição dos casos pelas diferentes formas macroscópicas está de acordo com o descrito na literatura [180, 219], e influenciou a sobrevida dos doentes, associando-se os tumores infiltrativos e ulcero-infiltrativos a sobrevidas menores (mediana de 12 meses e 30% aos 5 anos, respectivamente) [434].

Do mesmo modo, os tumores com padrão de crescimento infiltrativo segundo a classificação de Ming, para além de terem sido mais frequentes ao longo dos períodos, associaram-se a sobrevidas inferiores (34%), o que está de acordo com a literatura [215-217].

Os dois tipos histológicos principais segundo a classificação de Laurén, intestinal e difuso [14], estão associados a aspectos epidemiológicos, clínicos e patológicos distintos e a diferenças significativas na sobrevida dos doentes.

Neste estudo, em todas as classificações histológicas analisadas (OMS, Laurén, Carneiro e colaboradores), observou-se um predomínio dos tumores do tipo intestinal (com a designação



de tubulares na classificação da OMS e de glandulares na classificação de Carneiro e colaboradores). Estes dados sugerem que Portugal ainda tem uma elevada incidência de cancro gástrico, uma vez que o adenocarcinoma intestinal predomina nas áreas com elevada incidência, enquanto o adenocarcinoma difuso é mais frequente nas áreas com incidências inferiores [474]. No entanto, na análise de acordo com os diferentes períodos, registou-se uma diminuição progressiva do tipo intestinal (de 56,11% para 43,88%) e uma relativa estabilidade do tipo difuso.

No que diz respeito ao tipo difuso segundo Laurén, este tipo de tumores foi mais frequente em idades mais jovens e apresentou uma relação sexo masculino/feminino de 1 : 3. Em oposição, os tumores do tipo intestinal foram mais frequentes nos doentes idosos e no sexo masculino (relação de 1,7 : 1). Estes achados estão de acordo com o descrito na literatura [1, 5, 14].

Os tumores do tipo difuso foram submetidos mais vezes a gastrectomia total (71,81%) do que os carcinomas de tipo intestinal (32,84%), tendo-se, no entanto registado menos ressecções do tipo R0 nos tumores difusos (71,05% vs 85,53%), o que está relacionado com a tendência para a multifocalidade deste tipo de tumores.

A mesma tendência de maior radicalidade cirúrgica para os tumores do tipo difuso foi observada no que diz respeito ao tipo de linfadenectomia, com mais linfadenectomias do tipo D2 em comparação com os carcinomas do tipo intestinal.

Assim, a maior radicalidade na cirurgia dos tumores do tipo difuso teve em conta o facto dos doentes com este tipo de tumores serem mais jovens e se associaram a maior agressividade biológica e, por conseguinte, a pior prognóstico [216]. Os nossos resultados confirmam estes factos, pois os tumores do tipo difuso associaram-se a categorias mais avançadas em todos os parâmetros do estadiamento [progressão na parede (T), metastização ganglionar (N) e estadio]. Apesar da maior agressividade cirúrgica, a agressividade biológica destes tumores prevaleceu, o que levou a curvas de sobrevida inferiores (37% aos 5 anos) em comparação com o tipo intestinal (46% aos 5 anos).

Relativamente à forma macroscópica e à classificação de Ming, os tumores difusos foram mais vezes infiltrativos e ulcero-infiltrativos e apresentaram mais frequentemente um padrão de crescimento infiltrativo na histologia (classificação de Ming), o que está de acordo com a literatura [434].

No que diz respeito à invasão venosa e à invasão perineural, a primeira associou-se ao tipo intestinal e a segundo ao tipo difuso.

Tendo em consideração o exposto anteriormente confirma-se que os tipos intestinal e difuso da classificação de Laurén são entidades clínico-patológicas distintas com diferenças significativas na sobrevida dos doentes.

Na nossa série, a invasão venosa estava presente em mais de metade dos doentes (56,96%) assim como a invasão perineural (54,05%). Por outro lado, a permeação linfática nos tumores sem metastização ganglionar (N0) foi observada em cerca de metade (46,2%) dos casos. A presença destes três parâmetros patológicos traduziu-se em curvas de sobrevida inferiores (23%, 31% e 25% aos 5 anos, respectivamente) em comparação com os casos em estavam



ausentes (56%, 70% e 56%, respectivamente), o que está de acordo com o descrito na literatura [180, 196, 219, 248]

Neste estudo 28,03% dos tumores apresentavam expressão de p53 por IHQ com anticorpo monoclonal. Esta percentagem está de acordo com os estudos prévios do nosso grupo [435] assim como com vários estudos internacionais (19 a 29%) [221, 265, 273, 475-478]. No entanto, outros estudos mostram percentagens mais elevadas (34 a 65%) [269, 479-491], podendo esta variabilidade na percentagem de expressão ser devida a diferenças na metodologia utilizada no estudo da expressão de p53 [435].

A presença de expressão de p53 no nosso estudo associou-se a sobrevidas inferiores (15 % vs 38% aos 5 anos) o que está de acordo com a literatura [263, 266, 269, 435, 461, 482-483, 486, 488, 492-496].

Segundo o descrito na literatura, a presença de expressão de p53 poderá influenciar a resposta à quimioterapia (QT) [497]; assim, a identificação da expressão de p53 poderá ser uma ferramenta adicional para a identificação de subgrupos com carcinomas gástricos mais agressivos que poderão beneficiar de QT neo-adjuvante [288-289, 435, 482, 485, 498-502].

A percentagem de tumores com expressão de HER2 (IHQ) foi de 15,09%, o que está de acordo, quer com os estudos mais recentes (16 a 23%) [243, 503-505] quer com os estudos da década de 90 (9-38%) [245, 506]. Por outro lado, de acordo com os dados da literatura, a expressão de HER2 pesquisada por FISH está presente em 3,8 a 12,2% dos tumores gástricos [238, 243, 250, 507-510]. Enquanto a concordância entre IHQ e FISH nos estudos da década de 90 era baixa [511-512], os estudos actuais apresentam uma concordância bastante superior [250, 503-504].

A expressão de HER2 associou-se nesta série a um pior prognóstico (sobrevida aos 5 anos: 13% vs 36%), o que está de acordo com os estudos prévios do nosso grupo [248, 252] assim como com os estudos internacionais [221, 238-247, 249-251], o que poderá ter importantes implicações no tratamento, nomeadamente a terapêutica com anticorpos monoclonais como o trastuzumab (actualmente encontra-se em curso um ensaio clínico de fase III – ToGA – com resultados preliminares promissores) [249, 504-505, 513].

A percentagem de EGC na nossa série foi muito baixa (12,68%) em comparação com outros países com elevada incidência de carcinoma gástrico, como é o caso de Japão (30 a 50%) [125]. Este tipo de tumores apresenta um baixo risco de metastização ganglionar e por conseguinte um bom prognóstico, mesmo se submetido a tratamentos mais conservadores como acontece nos tratamentos endoscópicos (REM/DES) [3].

A análise dos EGC reveste-se de uma enorme importância, pois o diagnóstico precoce parece-nos o caminho para melhoria da sobrevida, ainda sombria, do carcinoma gástrico.

No que diz respeito ao tratamento, todos os EGC foram submetida a cirurgia de ressecção completa (R0), em oposição aos tumores avançados dos quais só foram ressecáveis em 59,61% dos casos, e destes, a ressecção foi R0 em 73,07% dos doentes.



Em termos de cirurgia de ressecção gástrica, verificou-se uma tendência para cirurgias menos alargadas (59,56% de gastrectomias subtotais distais) nos EGC em comparação com os tumores mais avançados (47,49%). Nas cirurgias de ressecção, foram realizadas linfadenectomias menos alargadas (D1) nos EGC em comparação com os tumores mais avançados. Estes dois aspectos realçam a importância do diagnóstico dos carcinomas gástricos quando ainda são EGC, pois este tipo de tumores apresenta-se como sendo a situação ideal em que a cirurgia por si só pode levar a elevadas taxas de cura.

Em relação ao perfil patológico dos EGC, estes tumores apresentaram características associadas a melhor prognóstico em todos os parâmetros: menores dimensões tumorais ($2,61 \pm 1,79$ cm), formas vegetantes e ulceradas na macroscopia, tumores bem diferenciados na classificação de OMS, tipo intestinal de Laurén, tipo glandular na classificação de Carneiro e colaboradores, crescimento expansivo na classificação de Ming, ausência de invasão venosa, ausência de permeação linfática (presença de apenas 14% nos tumores sem metastização ganglionar, N0) e ausência de invasão perineural.

É de realçar que a metastização ganglionar apenas esteve presente em 23,87% dos EGC [*dados não apresentados*], o que está de acordo com o descrito na literatura [134]. Sendo este parâmetro um dos principais factores de prognóstico do carcinoma gástrico [180], a baixa da taxa de metastização ganglionar no EGC aliada à elevada ressecabilidade destes tumores será responsável pelas curvas de sobrevivência superiores destes doentes.

Assim, todos estes aspectos previamente apresentados traduziram-se no prognóstico dos doentes com EGC, tendo-se observado que as curvas de sobrevivência cumulativa foram significativamente superiores (73% aos 5 anos) em comparação com as dos doentes com tumores avançados (26% aos 5 anos), mas inferiores à dos países Orientais (sobrevivência aos 5 e aos 10 anos superiores a 95%)[128-129]. No entanto, as curvas de sobrevivência dos doentes com tumores avançados aumentaram ao longo dos períodos (18% vs 27% vs 38%). Este facto poderá dever-se à ressecabilidade e radicalidade cirúrgicas crescentes assim como à crescente utilização dos tratamentos neo-adjuvantes (QT e RT) que permitem um *downstaging* dos tumores mais avançados e permitindo maiores taxas de ressecabilidade e de ressecções R0 [514]

Mais de um terço (38,18%) dos tumores apresentavam invasão da serosa e mais de dois terços (72,76%) eram tumores T3-4. Esta observação confirma a tendência para o diagnóstico tardio do carcinoma gástrico no nosso país. Neste subgrupo de doentes com invasão da serosa, a realização de citologia peritoneal durante a cirurgia é de grande importância para a melhor compreensão de como se processa a progressão e a disseminação do carcinoma gástrico localmente avançado. No nosso estudo, os casos de citologia positiva (11,66%) associaram-se a uma sobrevivência menor (mediana de 11 meses) em comparação com os casos de citologia negativa (40% aos 5 anos).

No momento do diagnóstico, dois terços dos doentes já apresentavam metastização ganglionar (um dos factores de prognóstico mais importantes) [179-180, 515-519], o que terá um peso importante na baixa taxa de sobrevivência aos 5 anos da nossa população. Por outro



lado, estas observações confirmam a hipótese de que o risco de metastização ganglionar aumenta com a progressão do tumor ao longo da parede gástrica. Mesmo nos tumores sem metastização ganglionar, cerca de metade dos doentes (46,2%) já apresentava permeação linfática, que parece associar-se à presença de micrometástases (segundo estudos prévios do nosso grupo [520] assim como de outros grupos [521-524]) que poderão ser responsáveis pelo aparecimento de recidivas neste subgrupo de doentes [519].

A avaliação da metastização ganglionar pelo rácio entre os gânglios metastizados e os gânglios ressecados foi um bom estratificador em termos de sobrevida (53% aos 5 anos para valores $\leq 0,2$ vs 21% para valores $> 0,2$) tendo sido identificado como factor de prognóstico independente na análise pela regressão de Cox. Segundo a literatura, vários estudos confirmam o rácio ganglionar como o melhor método para avaliar a metastização ganglionar, sendo a melhor forma de diminuir a migração de estadio [181-188].

Assim, as tendências anteriormente descritas quer para a progressão do tumor na parede (T) quer para metastização ganglionar (N), reflectiram-se na presença de estadios avançados (III-IV) em mais de metade (54,875) dos doentes da nossa série.

Em relação à análise de sobrevida, a nossa série apresentou uma taxa de sobrevida global aos 5 anos de 33,7%. No entanto, registou-se uma tendência para melhoria da taxa de sobrevida aos 5 anos ao longo dos períodos (26% vs 34% vs 43%).

A sobrevida aos 5 anos dos doentes submetidos a cirurgia de ressecção foi de 41% e apesar de se manter distante dos valores que têm sido publicados em trabalhos oriundos de alguns centros japoneses de referência [142, 146-147], aumentou ao longo do tempo (34% vs 38% vs 54%) [dados não apresentados].

Assim, a melhoria das curvas de sobrevida cumulativa dos doentes da nossa série deveu-se principalmente ao efeito da cirurgia, nomeadamente o aumento da ressecabilidade dos tumores distais, e à radicalidade da cirurgia realizada, com o aumento das ressecções completas (R0) e das linfadenectomias mais alargadas. Esta explicação é reforçada pelo facto do diagnóstico precoce, traduzido pela taxa de EGC, não ter variando ao longo dos períodos bem como a presença de metastização ganglionar, que na regressão de Cox foi identificada como factor de prognóstico independente quando classificada através do rácio ganglionar, tendo-se mantido praticamente estável ao longo do tempo.

Para além do rácio ganglionar anteriormente referido, a progressão do tumor na parede e a idade dos doentes foram os outros factores de prognóstico independente identificados na análise multivariada. Estes resultados estão de acordo com os de outros estudos que demonstram que o prognóstico dos carcinomas gástricos depende, fundamentalmente, do estadio [140, 179-180, 219]. Já no que diz respeito à idade, a literatura não é totalmente concordante, havendo estudos que apontam em direcções opostas [189-190, 452].

No entanto, parece emergir a noção de que o tratamento cirúrgico, ou ainda não evoluiu ao ponto de ser suficiente para tratar de forma exclusiva os carcinomas do estômago ou nunca será suficiente para isoladamente atingir este objectivo. Pelo que, enquanto não forem aperfeiçoadas novas formas terapêuticas, tais como o tratamento neoadjuvante [514], a



quimioterapia intraperitoneal [525-526] ou a imunoquimioterapia [527-528], ou enquanto não surgirem novas drogas anti-tumorais mais eficazes e menos tóxicas [529-530], a melhoria dos resultados no carcinoma do estômago, entre nós, deverá passar pela aposta no diagnóstico mais precoce destas lesões malignas [6, 471, 529].

Em Portugal não parecem estar reunidas as condições sociais, económicas e até culturais necessárias à implementação de campanhas de rastreio. Mesmo no Japão (país usualmente citado como exemplo destas práticas) a não adesão a estes programas é relativamente comum, observando-se diferenças entre a taxa global de EGC e percentagem de tumores iniciais nos doentes submetidos a rastreio (50% vs 80%) [434]. Assim, será necessário investir na procura de novas formas menos invasivas para o diagnóstico precoce, nomeadamente novos biomarcadores serológicos baseados nas alterações da glicosilação das proteínas.

Alterações da O-glicosilação das proteínas: Biomarcadores para diagnóstico precoce de carcinoma gástrico

A avaliação das alterações da O-glicosilação de proteínas no cancro gástrico, realizada através do estudo imunohistoquímico, revelou uma elevada incidência da expressão dos antígenos de carboidratos simples das mucinas (Tn, STn, T e ST) e dos antígenos de carboidratos do tipo Lewis (SLe^a e SLe^x) na população estudada.

A detecção dos antígenos simples das mucinas no complexo Golgi representa, em grande parte, a presença normal dos glicanos precursores nos passos iniciais da glicosilação [531-532]. Por outro lado, na membrana celular da mucosa gástrica normal nunca é observada imunorreactividade para qualquer um destes antígenos [531-532].

Dois estudos prévios do nosso grupo [359, 532] observaram a presença dos antígenos simples das mucinas na mucosa gástrica normal, um deles teve em conta as seguintes percentagens globais: 100% de expressão de Tn, 13,8% de STn, ausência de expressão T e 6,9% de ST; e o outro estudo analisou a expressão nas diferentes localizações: expressão de Tn em 100% das células quer no antro quer no corpo gástricos, 55% de expressão de STn no antro e 20% no corpo, 45% de expressão de T quer no antro quer no corpo e 50% de expressão de ST no antro e 45% no corpo.

Nas lesões precursoras, como a metaplasia intestinal, também foi observada a presença destes antígenos, tendo-se expressado STn nas células caliciformes (*globet*) e Tn nas células colunares [359, 531-535]. A expressão de STn associa-se mais vezes a metaplasia intestinal incompleta (100%) do que completa (55,6%) [532, 536]. O antígeno T também está frequentemente associado à metaplasia intestinal incompleta [532].

No caso da displasia e dos pólipos adenomatosos, a expressão de STn é frequente (>87,5%), sendo o T também expresso em alguns casos (37,5%), pelo que este padrão de expressão poderá ser utilizado como marcador do potencial maligno nas lesões pré-malignas [532].

Relativamente ao nosso estudo, confirmou-se a presença de expressão de STn nas células caliciformes nos casos de metaplasia intestinal associada a carcinoma gástrico [dados não



apresentados], no entanto, a nossa atenção centrou-se na expressão destes antígenos nas células tumorais.

Em todos os casos de expressão de cada um dos antígenos observou-se uma imunoreactividade citoplasmática difusa ou membranar apical, típica das células cancerígenas, em oposição à marcação supranuclear que acontece na mucosa gástrica normal. Com a excepção dos antígenos T e ST (antígenos com expressão menos frequente e com imunoreactividade menos marcada), todos os outros antígenos (Tn, STn, SLea e SLex) apresentaram, na maioria dos casos com expressão, uma imunoreactividades em mais de 25% das células em áreas bem definidas.

Assim, verificou-se neste estudo uma a expressão de **Tn** em 100% dos casos. Este antígeno é o primeiro a ser sintetizado na *O*-glicosilação das mucinas e normalmente está expresso no complexo de Golgi (região supranuclear) onde se processa a síntese de cadeias de carboidratos. No entanto, a expressão citoplasmática difusa, como foi o caso de todos os nossos doentes, representa uma forma imatura aberrante, que se associa ao cancro. Esta percentagem é idêntica à descrita em alguns estudos (96,1 a 98%) [537-538] e ligeiramente superior à dos estudos prévios do nosso grupo (91,9%) [359].

A expressão de **STn** foi de 94,4% e de 83,3% conforme o anticorpo monoclonal utilizado para a sua detecção, TKH2 e B72.3 respectivamente. Esta percentagem é superior à dos estudos prévios do nosso grupo (79,3%) [359] e à de outros grupos (50 a 75%) (Thor, Ohuchi et al. 1986; Iwata, Itzkowitz et al. 1993; Werther, Rivera-MacMurray et al. 1994; Yamada, Watanabe et al. 1995)[534-535, 539]. Num dos primeiros estudos nesta área, desenvolvido por Kjeldsen e colaboradores em que foi realizada a pesquisa deste antígeno, quer com o anticorpo TKH2 quer com o anticorpo B72.3 em 10 carcinomas gástricos, observou-se uma percentagem de expressão de 100% para ambos os casos [367]. Os estudos mais recentes revelaram percentagens idênticas (89,6%) à do nosso estudo [538]. Um estudo de Werther e colaboradores [540], que avaliou a expressão de STn em países com taxas de incidência diferentes, concluiu que as discrepâncias na percentagem de expressão deste antígeno se relacionam com a incidência de carcinoma gástrico na população estudada, nomeadamente dos tumores mais avançados, uma vez que as lesões precoces (EGC) têm menor probabilidade de expressar STn do que os tumores avançados.

Na literatura [540] observa-se uma discrepância entre a expressão de STn nos tecidos e no soro, com tendência para uma expressão menor deste antígeno no soro (13 a 43%) [533, 541-545].

A expressão de **T** (19,4%) do estudo actual foi idêntica à dos estudos prévios do nosso grupo (20,7%) [359], mas inferior à de outros estudos mais recentes (27,3% a 45,9%) [538, 546].

No presente estudo, a expressão de **ST** foi de 55,6% o que está de acordo com os estudos mais recentes (53,2%) [538], embora seja bastante superior à dos estudos prévios do nosso grupo (19,5%) [359].

Ao contrário dos estudos prévios [359], em que 40% dos casos apresentavam a expressão concomitante de T e de ST, nesta série, 24 doentes (66,7%) apresentaram a expressão de



ambos, o que significa que possuíam a $\beta 3$ Gal-Ts necessária para a síntese do antígeno Thomsen-Friedenreich (T) e que em 70,8% destes casos (17/24) este antígeno encontrava-se mascarado pelo ácido siálico (ST).

Num estudo de Carneiro e colaboradores [532] com mucosa gástrica normal, o padrão de expressão do T (em termos de localização) antes e depois da neuraminidase (ST) foi idêntico, indicando assim que o antígeno T nestes casos não estava mascarado pelo ácido siálico.

Em suma, estes resultados mostram que no caso dos carcinomas gástricos, as vias de biossíntese dos antígenos de carboidratos simples das mucinas favorecem a expressão de Tn e de STn (percentagens bastante mais elevadas) em comparação com a expressão de T (percentagem relativamente baixa). Este facto poderá ser explicado pelos diferentes níveis de expressão ou de eficiência catalítica das enzimas GalNAc $\alpha 2,6$ -sialiltransferase (ST6GalNAc-T) e *core 1* $\beta 1$ -3-galactosiltransferase (C1Gal-T1), uma vez que ambas as enzimas competem pelo Tn como substrato para formar o STn ou o T, respectivamente [547]. Outra explicação poderá ser que a competição das enzimas responsáveis pela adição de GlcNAc para a formação das estruturas do *core 2* ou das sialiltransferases que adicionam o ácido siálico à galactose, seja responsável pelos baixos níveis de T [349, 548]. Pelo que foi exposto previamente, uma vez que no nosso estudo, numa elevada percentagem dos casos, o antígeno T encontrava-se mascarado pelo ácido siálico, esta segunda hipótese parece-nos mais provável, tal como já tinha acontecido num estudo prévio do nosso grupo [538].

Em relação aos antígenos de carboidratos do tipo Lewis, a percentagem de expressão de **SLe^a** e de **SLe^x** foi de 77,8% e de 80,6%, respectivamente. Na literatura, a expressão de SLe^a no carcinoma gástrico varia entre 49,2 e 89% [549-550], enquanto a de SLe^x se situa entre 45,9 e 94% [550-551].

A correlação da expressão de SLe^a nos tecidos e no soro varia entre 41,7 e 72%, consoante os estudos [550, 552].

A expressão destes antígenos na mucosa gástrica normal foi estudada em alguns trabalhos [549-551, 553] podendo variar para o SLe^a entre 7 e 37% e para o SLe^x entre 0 e 50,8%.

Na literatura está descrita a expressão de SLe^a e de SLe^x em lesões gástricas pré-malignas, nomeadamente a metaplasia intestinal, não havendo diferenças de expressão nos subtipos de metaplasia (completa ou incompleta) [531, 554].

Todos os casos apresentaram expressão de pelo menos 2 dos antígenos estudados. Dois terços dos doentes (66,7%) apresentaram expressão de 4 ou 5 dos antígenos estudados.

A correlação entre os antígenos de carboidratos simples das mucinas foi elevada, variando entre 42,9% (correlação entre o T - o menos frequente - e o ST) e 100% (correlação entre 2 anticorpos para o STn - TKH2 e B72.3; e entre o STn e o ST).



A correlação entre os dois antígenos de carboidratos do tipo Lewis foi de 100%, uma vez que em todos os casos com expressão de SLe^a se associou a expressão de SLe^x.

Em dois estudos, Nakasaki e colaboradores [555-556] observaram a presença de mosaïcismo na expressão de um painel de antígenos de carboidratos associados a tumores (nos quais se incluíam o STn e o SLe^x), através da expressão de duas ou mais populações celulares separadas espacialmente com padrões de expressão de diferentes antígenos. Este processo reflecte a influência das alterações da glicosilação nas diferentes etapas da diferenciação e progressão tumorais.

Assim o estudo de um painel de antígenos, tal como foi realizado no nosso estudo, poderia ultrapassar as limitações relacionadas com a sensibilidade e a especificidade dos biomarcadores actuais, tendo em conta a elevada correlação entre os diferentes antígenos deste estudo e a presença de mosaïcismo na expressão deste tipo de antígenos nos carcinomas gástricos.

Uma das limitações desta parte do estudo foi o número de casos estudados (36) que poderá ter tido influência no poder estatístico das associações entre o padrão de expressão dos antígenos em questão e os diferentes parâmetros clínico-patológicos estudados.

A expressão de **Tn** (em mais de 50% das células) associou-se significativamente com a invasão venosa e observou-se uma tendência para a invasão perineural, mas sem significado estatístico.

Relativamente ao **STn**, observaram-se diferenças no que diz respeito à localização, no entanto, essas diferenças não foram concordantes na pesquisa da expressão com os diferentes anticorpos monoclonais (TKH2 e B72.3). Assim, a tendência para uma menor expressão de STn pesquisada através do B72.3 nos tumores do fundo e corpo não foi observada na pesquisa do mesmo antígeno com o TKH2. O mesmo aconteceu relativamente às diferenças encontradas entre a expressão de STn (em mais de 50% das células) pesquisada através do B72.3 e a forma macroscópica. Estas discordâncias possivelmente devem-se, como já foi referido, às limitações do poder estatístico das associações encontradas.

A associação descrita na literatura entre a expressão de STn e o tipo intestinal da classificação de Laurén [555, 557-559] não se verificou nesta série. Tal como em estudos prévios do nosso grupo [359], não se observaram diferenças no padrão dos antígenos de acordo com as classificações histológicas (OMS, Laurén, Carneiro e colaboradores) e com o padrão de crescimento (classificação de Ming).

A expressão do antígeno **T** associou-se a idades mais avançadas e ao sexo feminino, tendo apresentado uma tendência para a associação com tumores de maiores dimensões. Num estudo de Chung e colaboradores [546] a associação entre a expressão de T e idade mais avançadas foi observada, no entanto sem significado estatístico.



As **formas sialiladas do antígeno Tn e do antígeno T** (STn e ST, respectivamente) mostraram uma tendência para a associação com as formas macroscópicas vegetantes e ulcero-vegetantes, mas sem significado estatístico.

Quanto aos antígenos de carboidratos do tipo Lewis, a expressão de **SLe^a** e de **SLe^x** apenas se associou com a dimensão de tumor, tendo-se observado a presença de dimensões tumorais menores nos casos com expressão marcada (mais de 50% das células) destes antígenos. Esta observação é contrária ao que está descrito da literatura, em que a expressão de SLe^a se associa a tumores de maiores dimensões [560].

De acordo com os diferentes parâmetros do estadiamento dos carcinomas gástricos, a expressão de **Tn** (em mais de 50% das células) associou-se à presença de tumores mais avançados relativamente à progressão tumoral na parede, nomeadamente com invasão da serosa. A mesma associação foi observada em relação à metastização ganglionar (avaliada pelo rácio ganglionar). Por conseguinte, a expressão marcada de Tn também se associou a estadios mais avançados.

Na literatura, a expressão dos antígenos simples das mucinas apresenta valor prognóstico [364]. O antígeno **STn** é descrito com um factor que influencia o prognóstico dos doentes com cancro [379], nomeadamente no carcinoma gástrico [380-381, 533, 535, 540-541, 559, 561]. A presença deste antígeno no carcinoma gástrico associa-se a factores relacionados com a agressividade biológica dos tumores (invasão da serosa, metastização ganglionar, permeação linfática e invasão venosa) [380-381, 533, 540-541, 559]. A influência no prognóstico encontrada nestes estudos apenas era relativa aos tumores mais avançados, pelo que a associação da expressão de STn a menor sobrevida dos doentes parece dever-se mais ao efeito do estadio dos tumores do que à própria expressão do antígeno [540].

Num estudo de Yamada e colaboradores, observou-se a mesma associação dos parâmetros relacionados com a agressividade biológica e a detecção de STn no soro, existindo uma relação entre a intensidade da expressão do STn nos tecidos através de IHQ com TKH2 e o nível sérico deste antígeno [533]. No presente estudo, a expressão do antígeno STn associou-se à presença de metastização ganglionar avaliada pelo rácio ganglionar.

Apesar de não termos avaliado o efeito da expressão destes antígenos na sobrevida dos doentes devido ao tipo de estudo que realizamos (tempo de *follow-up* dos doentes ainda muito curto), observamos a associação do padrão de expressão de Tn e STn com parâmetros patológicos classicamente associados a pior prognóstico (progressão do tumor na parede, metastização ganglionar, estadio, invasão venosa), alguns dos quais já tinham sido identificados como factores de prognóstico independentes na análise multivariada realizada na primeira parte deste estudo (*vide supra*).

A associação da expressão de **T** e **ST** com a invasão da serosa, a presença de metástases ganglionares e a presença de estadios avançados descrita em estudos prévios [359, 546] não se observou nesta série, uma vez que, neste estudo, os antígenos T e ST não apresentaram diferenças no padrão de expressão de acordo com os parâmetros do estadiamento. Tendo em



conta que a nossa série é relativamente pequena e estes antígenos são os menos expressos, possíveis associações poderão ter sido limitadas pelo poder estatístico desta análise. Num estudo de Chung e colaboradores, a expressão de T é indicada como factor de prognóstico nos estadios mais avançados [546].

A expressão dos antígenos do tipo **Lewis** associou-se a categorias mais avançadas nos diferentes parâmetros do estadiamento. Assim, a expressão de **SLe^a** associou-se com a progressão tumoral na parede, nomeadamente com a invasão da serosa, e com a metastização ganglionar. A expressão do **SLe^x** (em mais de 50% das células) também se associou com a progressão do tumor na parede e apresentou uma tendência, mas sem significado estatístico, para a metastização ganglionar e para os estadios mais avançados. Estas associações observadas estão de acordo com o descrito na literatura [554, 560, 562-564].

A expressão de SLe^a associa-se a pior prognóstico [398, 560, 565] e está descrita na literatura como sendo um indicador do modo de recorrência [560]. No presente estudo não foi analisada a sobrevida pelos motivos anteriormente referidos, no entanto, seria de esperar que a expressão dos antígenos do tipo Lewis se associasse a pior prognóstico, uma vez que se observou a associação dos parâmetros patológicos que têm maior influência na sobrevida dos doentes com a expressão destes antígenos.

Em suma, a carcinogénese gástrica relaciona-se com a O-glicosilação das proteínas do seguinte modo [531]:

1. Alterações que levam à glicosilação incompleta com acumulação de formas precursoras (imaturas) – antígenos Tn e T
2. Alterações com aumento da sialilação, que pára o processo de glicosilação, e, por conseguinte, aumenta a expressão das formas sialiladas (antígenos STn e ST; antígenos SLe^a e SLe^x)

Assim, de acordo com os resultados deste estudo e de outros [531], a aplicação prática da investigação das alterações da O-glicosilação de proteínas (quer das mucinas, quer do tipo Lewis) poderá ser a seguinte:

1. Biomarcadores para o diagnóstico precoce dos carcinomas gástricos [318]
2. Marcadores do potencial maligno das lesões pré-malignas (marcadores preditivos na metaplasia intestinal) [566]
3. Orientação terapêutica (cirurgia, QT/RT adjuvantes) devido à associação das formas sialiladas com a agressividade biológica deste tipo de tumores
4. *Follow-up* e detecção de recorrências [541, 567]



CONCLUSÕES

A análise dos resultados da **definição do perfil clínico-patológico e do prognóstico do carcinoma gástrico nas últimas duas décadas e a sua evolução ao longo do tempo** possibilita as seguintes conclusões:

A nossa realidade é compatível com as dos países com elevada incidência de cancro gástrico, pois registou-se um predomínio dos carcinomas distais (51,1%), sem se ter observado a migração proximal do cancro do estômago típica dos países do Ocidente que têm taxas de incidência mais baixas. Por outro lado, verificou-se uma elevada frequência de tumores do tipo intestinal (49,22%) que se associa aos factores ambientais das regiões com incidência mais alta, apesar da tendência para a sua diminuição ao longo do tempo, associando-se a uma relativa estabilidade da incidência dos tumores do tipo difuso.

Os carcinomas proximais e os distais são entidades diferentes de carcinoma gástrico, uma vez que apresentaram diferenças no perfil clínico-patológico nos seguintes parâmetros: sexo, dimensões tumorais, forma macroscópica, classificação de Laurén, invasão venosa, permeação linfática, invasão perineural, progressão do tumor na parede, metastização ganglionar e estadio. Em relação à idade não se observaram diferenças de acordo com a localização. As diferenças observadas nas curvas de sobrevida cumulativa entre as diversas localizações foram-se atenuando ao longo do tempo. Os carcinomas proximais (39% aos 5 anos) associaram-se a sobrevidas inferiores em relação aos tumores distais (46% aos 5 anos).

Os tumores do tipo intestinal e do tipo difuso, segundo a classificação de Laurén, apresentaram diferenças significativas nas seguintes características clínico-patológicas: idade, localização tumoral, forma macroscópica, classificação de Ming, invasão venosa e perineural, progressão do tumor na parede, metastização ganglionar e estadio. A distribuição dos casos pelo sexo de acordo com o tipo de Laurén foi concordante com a literatura. Apesar da maior agressividade cirúrgica relativamente aos tumores difusos, a agressividade biológica destes tumores prevaleceu pelo que, associada a menor número de ressecções do tipo R0 nestes tumores, foi responsável por curvas de sobrevida inferiores (37% aos 5 anos) em comparação com as do tipo intestinal (46% aos 5 anos).

A incidência de EOGC foi 10,59% e confirma-se que se trata de uma entidade clínica distinta, pois apresentou diferenças em relação aos restantes doentes em vários parâmetros do perfil clínico-patológico: dimensões tumorais, forma macroscópica, classificações histológicas (da OMS, de Laurén, de Carneiro e colaboradores, de Ming), invasão venosa e permeação linfática. Apesar de algumas destas características se associarem classicamente a um pior prognóstico, a sobrevida dos doentes com EOGC foi significativamente superior (44% aos 5 anos) em relação aos doentes idosos (embora as estas diferenças tenham diminuído ao longo do tempo), devido à maior agressividade e radicalidade cirúrgicas observadas neste grupo de doentes.

A incidência de EGC foi relativamente baixa (12,68%) e não variou ao longo do tempo. Este tipo de tumores apresentou características associadas a melhor prognóstico em todos os parâmetros: dimensões tumorais (menores), forma macroscópica (vegetantes e ulceradas), classificação de OMS (tubulares bem diferenciados), de Laurén (intestinal), de Carneiro e colaboradores (glandular), de Ming (expansivo), invasão venosa (ausência), permeação linfática (ausência) e invasão perineural (ausência). É de realçar que a metastização ganglionar estava presente numa percentagem relativamente pequena de doentes (23,87%), que aliada à



ressecabilidade completa destes tumores, foi responsável pela elevada taxa de sobrevida destes doentes (73% aos 5 anos).

Relativamente à evolução ao longo do tempo das características clínico-patológicas observaram-se diferenças, para além das anteriormente referidas, na classificação de Ming (aumento do crescimento infiltrativo) e na Invasão venosa (aumento da sua presença).

No que diz respeito ao tratamento dos doentes com carcinoma gástrico, a taxa de inoperabilidade foi 14,8% e registou-se uma tendência para a sua diminuição ao longo do tempo, enquanto a taxa de cirurgia de não ressecção permaneceu estável (19,1%). A ressecabilidade dos tumores só foi possível em dois terços dos doentes (66,12%) e para além se manter estável ao longo do tempo, foi inferior à dos centros europeus de referência (82,7% GGCS). A taxa da cirurgia de ressecção gástrica aumentou ao longo dos períodos estudados (de 73,96% para 83,45%), associando-se a uma opção crescente pela gastrectomia total (51,79%) que levou a aumento concomitante das ressecções do tipo R0 (79,86%). Associadamente, observou-se um aumento das linfadenectomias mais alargadas (D2, 53,87%) embora ainda se mantenha longe dos valores dos centros orientais. Esta melhoria, quer da extensão da linfadenectomia quer a ressecção completa (R0) dos tumores teve influência na sobrevida dos doentes (46% aos 5 anos nos casos de linfadenectomia D2 e 57% aos 5 anos nas ressecções R0).

Relativamente ao estadiamento não se observaram diferenças ao longo do tempo. Registou-se assim uma tendência para o diagnóstico tardio que se associou a estadios avançados (III-IV) em mais de metade (54,87%) dos tumores. Assim, no momento do diagnóstico, mais de um terço dos tumores (38,18%) apresentavam invasão da serosa e mais de dois terços (72,76%) eram T3-4; a mesma tendência verificou-se na metastização ganglionar com a sua presença em dois terços dos doentes (66,58%) e, inclusivamente nos tumores N0, observou-se a presença de permeação linfática em quase metade dos doentes (46,2%).

A sobrevida cumulativa dos doentes continua a ser baixa (33,7% aos 5 anos) e não variou significativamente ao longo do tempo (43% aos 5 anos). Mesmo nos tumores ressecados, a sobrevida aos 5 anos foi 41% e apesar de ter aumentado ao longo do tempo (54% aos 5 anos), mantém-se distante dos valores de alguns centros japoneses de referência.

Na análise da sobrevida de acordo com as diferentes características clínico-patológicas, os seguintes parâmetros associaram-se a curvas de sobrevida mais baixas: dimensões tumorais (maior), forma macroscópica (infiltrativa, ulcero-infiltrativa), Ming (infiltrativo), presença de invasão venosa, de permeação linfática e de invasão perineural, p53 (positivo), HER2 (positivo) e citologia (positiva).

A idade, a progressão do tumor na parede e a metastização ganglionar de acordo com o rácio ganglionar foram identificados como factores de prognósticos independentes.



Face ao exposto, concluiu-se que o prognóstico dos doentes com carcinoma gástrico continua sombrio devido principalmente ao diagnóstico tardio e o panorama actual não parecer estar a melhorar de forma significativa. Os pequenos avanços alcançados na melhoria da sobrevida deveram-se ao efeito da cirurgia, nomeadamente do aumento da sua radicalidade, no entanto, parece estar a esgotar-se o potencial desta forma terapêutica como meio de aumento da sobrevida no contexto actual. Emerge, assim, a necessidade premente de conseguir diagnosticar estas neoplasias em fases precoces da sua evolução. Uma vez que a nossa realidade ainda não reúne as condições necessárias para a implementação de formas de rastreio invasivas, será necessário apostar em formas menos invasivas de diagnóstico, nomeadamente através de novos biomarcadores serológicos.

A análise do estudo das **alterações da O-glicosilação das proteínas nos doentes com carcinoma gástricos** permitiu apontar as seguintes conclusões:

Os carcinomas gástricos ressecados apresentaram uma elevada incidência da expressão nos tecidos dos antígenos de carboidratos simples das mucinas (Tn, STn, T e ST) e dos antígenos de carboidratos do tipo Lewis (SLe^a e SLe^x).

O estudo da expressão de cada um dos antígenos anteriormente referidos, através de IHQ no tecido tumoral, mostrou na maioria dos casos uma imunorreactividade citoplasmática difusa ou membranar apical em mais de 25% das células em áreas bem definidas, com a excepção dos antígenos T e ST, que foram os antígenos com expressão menos frequente e com imunorreactividade menos marcada.

Observou-se a expressão de STn nas células caliciformes da metaplasia intestinal associada a carcinoma gástrico.

Todos os casos de carcinoma gástrico estudados apresentaram a expressão de pelos menos 2 dos antígenos e dois terços a expressão de 4 a 5. A correlação entre os antígenos simples das mucinas foi elevada, o mesmo acontecendo para os antígenos do tipo Lewis.

Na análise do perfil clínico-patológico dos carcinomas gástricos de acordo com o padrão de expressão destes antígenos observaram-se seguintes associações: **Tn** com a invasão venosa e a invasão perineural; **STn (TKH2)** com a localização tumoral e **STn (B72.3)** com a localização tumoral e a forma macroscópica; **T** com a idade, o sexo, as dimensões e a localização tumorais; **ST** com a forma macroscópica e a classificação da OMS; **SLe^a** e **SLe^x** com as dimensões do tumor.

Relativamente ao estadiamento dos tumores também se verificaram associações com a expressão destes antígenos: **Tn** com a progressão do tumor na parede (nomeadamente com a invasão da serosa), a metastização ganglionar e o estadio; **STn (TKH2)** com metastização ganglionar (rácio ganglionar); **SLe^a** com a progressão do tumor na parede (nomeadamente a invasão da serosa) e a metastização ganglionar; **SLe^x** com a progressão do tumor na parede, a metastização ganglionar e o estadio. Os antígenos T e ST não mostraram diferenças no padrão de expressão de acordo com o estadiamento.



Assim, concluiu-se que as alterações da *O*-glicosilação das proteínas estão relacionadas com o carcinoma gástrico, quer pela sua elevada incidência quer pela sua associação a diversas características clínico-patológicas destes tumores. O conhecimento obtido através este estudo poderá funcionar como ponto de partida para futuras investigações, tendo como objectivo a identificação de novos biomarcadores com base em alterações da glicosilação de proteínas.



CONSIDERAÇÕES FINAIS

As alterações da glicosilação são um potencial alvo para a descoberta de biomarcadores. Assim, o conhecimento acumulado da investigação sobre as alterações da *O*-glicosilação, no qual este estudo se inclui, poderá ser utilizado na identificação de biomarcadores serológicos através das novas técnicas glicoproteómicas.

Os anticorpos usados na clínica para detecção de cancro baseiam-se ou no *core* proteico (CA125, CA15-3), ou em glicanos aberrantes (CA19-9, CA72-4), não havendo ainda anticorpos específicos para glicoproteínas com glicanos específicos de cancro. Para ultrapassar esta limitação é necessário o desenvolvimento de estratégias de identificação e produção de anticorpos dirigidos, quer aos epítomos do *core* proteico quer às formas imaturas de *O*-glicanos associados ao cancro, nomeadamente Tn, STn, T e ST. Neste sentido, têm sido realizados vários estudos para a detecção destas glicofórmulas através do desenvolvimento de anticorpos monoclonais para estes epítomos na MUC1 [568].

Assim, após a confirmação, através do presente estudo, da associação frequente destes antígenos ao carcinoma gástrico e a sua relação com várias das características clínico-patológicas e prognósticas deste tipo de tumores, o próximo passo será a realização de mapas 2D glicoproteómicos baseados nos antígenos e anticorpos utilizados neste estudo para identificação de glicoproteínas que sejam portadoras (*carriers*) destas alterações da glicosilação.

As proteínas abundantes do soro interferem com a identificação de potenciais biomarcadores, uma vez que estas glicoproteínas se encontram em pequenas quantidades no soro [569-570]. Assim, com intuito de reduzir a complexidade do processo, será necessária a remoção das proteínas abundantes, como a albumina e as imunoglobulinas, através de kits de depleção e da proteína A agarose, seguida de cromatografia de afinidade com as lectinas (*Lectin affinity chromatography*, LAC) para a captura, por afinidade, de glicoproteínas com conformações de glicanos específicos para cada uma das lectinas (*Artocarpus intergrifolia lectin*, AIL para o antígeno T; *Sambucus nigra agglutinin*, SNA para o antígeno STn; e *Helix pomatia agglutinin*, HPA para o antígeno Tn) [571].

Posteriormente, para aumentar a sensibilidade, poderá ser realizada a separação das proteínas por HLPC (*High Performance Liquid Chromatography*), que se baseia nas suas propriedades químicas e físicas (hidrofobicidade e peso molecular) ou por electroforese 2D que se baseia no ponto isoeléctrico ou no peso molecular.

Após todo este processo de separação das proteínas realizar-se-á a identificação dos epítomos pela técnica de *Western Blotting*, com a utilização de anticorpos específicos para cada um dos antígenos (os mesmos utilizados no presente estudo).

Finalmente, será realizada a espectrometria de massa (*Mass Spectrometry*, MS; técnica de MALDI-TOF) para a identificação das proteínas *carrier* das formas imaturas dos *O*-glicanos associadas a cancro através do cruzamento dos resultados da MS com as bases de dados da NCBI e da *Swissprot* [572-573].



A confirmação dos resultados poderá ser realizada através de técnica de PLA (*Proximity Ligation Assay*), que se baseia na detecção da proximidade de epítomos em tecidos ou células ou através da construção de *microarrays* com as proteínas *carrier* das formas alteradas da glicosilação. Um estudo recente do nosso grupo confirmou a MUC2 como sendo o *carrier* do STn na metaplasia intestinal e no carcinoma gástrico através da técnica de PLA [362].

A habilidade do sistema imune em produzir elevadas quantidades de anticorpos em presença de pequenas quantidades de antígenos faz com que seja um biossensor natural dos antígenos associados ao cancro. Por outro lado, uma vez que a maioria das proteínas *O*-glicosiladas que derivam de uma célula cancerígena apresentam *O*-glicanos semelhantes, incluindo o Tn, STn, T e ST, estes epítomos específicos de cancro também estarão presentes em outras *O*-glicoproteínas expressas pelos diferentes carcinomas. Apesar de incluírem os mesmos *O*-glicanos, a contribuição da proteína base fará com que estes epítomos sejam únicos para aquela glicoproteína.

O objectivo final será a construção de testes de diagnóstico através, quer da técnica de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) quer da tecnologia de *microarray* de glicopeptídeos, que identifiquem os auto-anticorpos que são produzidos pelo organismo nas fases muito iniciais da progressão da doença oncológica, ou seja, numa fase muito anterior à manifestação clínica do tumor [Figura 37]. Assim, a utilização destes novos biomarcadores serológicos seria uma forma não invasiva de diagnóstico precoce que poderia ser facilmente utilizada no rastreio da população.

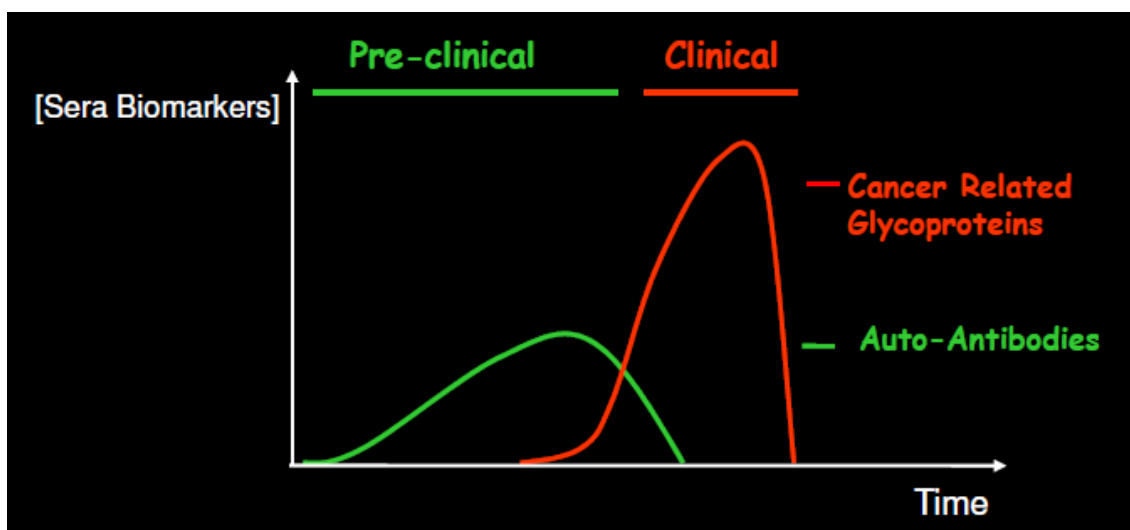


Figura 37. Representação gráfica da tradução sérica da progressão da doença neoplásica (de realçar a resposta do sistema imune nas fases iniciais com a produção de auto-anticorpos, *marcado a verde*)

Portanto, a investigação do glicoproteoma sérico e a identificação de novos biomarcadores serológicos com o objectivo do diagnóstico precoce serão as cenas dos próximos capítulos na sempre aliciante luta contra o cancro do estômago.



BIBLIOGRAFIA

1. Parkin, D.M., et al., *Global cancer statistics, 2002*. CA Cancer J Clin, 2005. **55**(2): p. 74-108.
2. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2009*. CA Cancer J Clin, 2009. **59**(4): p. 225-49.
3. Catalano, V., et al., *Gastric cancer*. Crit Rev Oncol Hematol, 2009. **71**(2): p. 127-64.
4. Ajani, J.A., P.F. Mansfield, and D.M. Ota, *Potentially resectable gastric carcinoma: current approaches to staging and preoperative therapy*. World J Surg, 1995. **19**(2): p. 216-20.
5. Crew, K.D. and A.I. Neugut, *Epidemiology of gastric cancer*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(3): p. 354-62.
6. Msika, S., et al., *Population-based study of diagnosis, treatment and prognosis of gastric cancer*. Br J Surg, 1997. **84**(10): p. 1474-8.
7. Bertuccio, P., et al., *Recent patterns in gastric cancer: a global overview*. Int J Cancer, 2009. **125**(3): p. 666-73.
8. Mathers, C.D. and D. Loncar, *Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030*. PLoS Med, 2006. **3**(11): p. e442.
9. Yamamoto, S., *Stomach cancer incidence in the world*. Jpn J Clin Oncol, 2001. **31**(9): p. 471.
10. Ahn, Y.O., et al., *Incidence estimation of stomach cancer among Koreans*. J Korean Med Sci, 1991. **6**(1): p. 7-14.
11. Parkin, D.M., *International variation*. Oncogene, 2004. **23**(38): p. 6329-40.
12. Muir, C.S. and J.C. Harvey, *Cancer of the stomach: overview*, in *Gastric Cancer*, T. Sugimur and M. Sasako, Editors. 1997: New York.
13. Parkin, D.M., S.L. Whelan, and J. Ferlay, *Cancer incidence in five continents*. 1997, International Agency for Research on Cancer: Lyon, France. p. 822-3.
14. Lauren, P., *The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. An Attempt at a Histo-Clinical Classification*. Acta Pathol Microbiol Scand, 1965. **64**: p. 31-49.
15. Munoz, N., et al., *Histologic types of gastric carcinoma in high- and low-risk areas*. Int J Cancer, 1968. **3**(6): p. 809-18.
16. Henson, D.E., et al., *Differential trends in the intestinal and diffuse types of gastric carcinoma in the United States, 1973-2000: increase in the signet ring cell type*. Arch Pathol Lab Med, 2004. **128**(7): p. 765-70.
17. Kaneko, S. and T. Yoshimura, *Time trend analysis of gastric cancer incidence in Japan by histological types, 1975-1989*. Br J Cancer, 2001. **84**(3): p. 400-5.
18. Pinto-de-Sousa, J., et al., *Clinicopathologic profiles and prognosis of gastric carcinomas from the cardia, fundus/body and antrum*. Dig Surg, 2001. **18**(2): p. 102-10.
19. El-Serag, H.B., et al., *Epidemiological differences between adenocarcinoma of the esophagus and adenocarcinoma of the gastric cardia in the USA*. Gut, 2002. **50**(3): p. 368-72.
20. Devesa, S.S., W.J. Blot, and J.F. Fraumeni, Jr., *Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States*. Cancer, 1998. **83**(10): p. 2049-53.
21. Powell, J. and C.C. McConkey, *Increasing incidence of adenocarcinoma of the gastric cardia and adjacent sites*. Br J Cancer, 1990. **62**(3): p. 440-3.
22. Brown, L.M. and S.S. Devesa, *Epidemiologic trends in esophageal and gastric cancer in the United States*. Surg Oncol Clin N Am, 2002. **11**(2): p. 235-56.
23. Blot, W.J., et al., *Rising incidence of adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia*. JAMA, 1991. **265**(10): p. 1287-9.
24. Pera, M., et al., *Increasing incidence of adenocarcinoma of the esophagus and esophagogastric junction*. Gastroenterology, 1993. **104**(2): p. 510-3.



25. Hansen, S., et al., *Esophageal and gastric carcinoma in Norway 1958-1992: incidence time trend variability according to morphological subtypes and organ subsites*. Int J Cancer, 1997. **71**(3): p. 340-4.
26. Moller, H., *Incidence of cancer of oesophagus, cardia and stomach in Denmark*. Eur J Cancer Prev, 1992. **1**(2): p. 159-64.
27. Harrison, S.L., M.J. Goldacre, and V. Seagroatt, *Trends in registered incidence of oesophageal and stomach cancer in the Oxford region, 1974-88*. Eur J Cancer Prev, 1992. **1**(3): p. 271-4.
28. Levi, F., C. La Vecchia, and V.C. Te, *Descriptive epidemiology of adenocarcinomas of the cardia and distal stomach in the Swiss Canton of Vaud*. Tumori, 1990. **76**(2): p. 167-71.
29. Armstrong, R.W. and B. Borman, *Trends in incidence rates of adenocarcinoma of the oesophagus and gastric cardia in New Zealand, 1978-1992*. Int J Epidemiol, 1996. **25**(5): p. 941-7.
30. Thomas, R.J., et al., *Incidence trends in oesophageal and proximal gastric carcinoma in Victoria*. Aust N Z J Surg, 1996. **66**(5): p. 271-5.
31. Liu, Y., S. Kaneko, and T. Sobue, *Trends in reported incidences of gastric cancer by tumour location, from 1975 to 1989 in Japan*. Int J Epidemiol, 2004. **33**(4): p. 808-15.
32. Correa, P. and V.W. Chen, *Gastric cancer*. Cancer Surv, 1994. **19-20**: p. 55-76.
33. Aragonés, N., et al., *Gastric cancer in the European Union (1968-1992): mortality trends and cohort effect*. Ann Epidemiol, 1997. **7**(4): p. 294-303.
34. Munoz, N. and S. Franceschi, *Epidemiology of gastric cancer and perspectives for prevention*. Salud Publica Mex, 1997. **39**(4): p. 318-30.
35. Parkin, D.M., P. Pisani, and J. Ferlay, *Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985*. Int J Cancer, 1993. **54**(4): p. 594-606.
36. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2002*. CA Cancer J Clin, 2002. **52**(1): p. 23-47.
37. Kelley, J.R. and J.M. Duggan, *Gastric cancer epidemiology and risk factors*. J Clin Epidemiol, 2003. **56**(1): p. 1-9.
38. Lilienfeld, A., *Epidemiology of gastric cancer*. N Engl J Med, 1972. **286**(6): p. 316-7.
39. Lunet, N., F. Pina, and H. Barros, *Regional trends in Portuguese gastric cancer mortality (1984-1999)*. Eur J Cancer Prev, 2004. **13**(4): p. 271-5.
40. Coleman, M.P., et al., *Trends in Cancer Incidence and Mortality*, in *IARC Scientific Publication No. 121*. 1993, IARC: Lyon, France.
41. Howson, C.P., T. Hiyama, and E.L. Wynder, *The decline in gastric cancer: epidemiology of an unplanned triumph*. Epidemiol Rev, 1986. **8**: p. 1-27.
42. La Vecchia, C., et al., *Electric refrigerator use and gastric cancer risk*. Br J Cancer, 1990. **62**(1): p. 136-7.
43. Brown, L.M., *Helicobacter pylori: epidemiology and routes of transmission*. Epidemiol Rev, 2000. **22**(2): p. 283-97.
44. Banatvala, N., et al., *The cohort effect and Helicobacter pylori*. J Infect Dis, 1993. **168**(1): p. 219-21.
45. Roosendaal, R., et al., *Helicobacter pylori and the birth cohort effect: evidence of a continuous decrease of infection rates in childhood*. Am J Gastroenterol, 1997. **92**(9): p. 1480-2.
46. Boyle, P. and J. Ferlay, *Cancer incidence and mortality in Europe, 2004*. Ann Oncol, 2005. **16**(3): p. 481-8.
47. Parkin, D.M., et al., *Estimating the world cancer burden: Globocan 2000*. Int J Cancer, 2001. **94**(2): p. 153-6.
48. Levi, F., et al., *Trends in mortality from major cancers in the European Union, including acceding countries, in 2004*. Cancer, 2004. **101**(12): p. 2843-50.
49. La Vecchia, C., et al., *Cancer mortality in Europe: effects of age, cohort of birth and period of death*. Eur J Cancer, 1998. **34**(1): p. 118-41.



50. Franceschi, S., et al., *Comparison of cancer mortality trends in major European areas, 1960-89*. Eur J Cancer Prev, 1994. **3**(2): p. 145-206.
51. Levi, F., F. Lucchini, and C. La Vecchia, *Worldwide patterns of cancer mortality, 1985-89*. Eur J Cancer Prev, 1994. **3**(2): p. 109-43.
52. Levi, F., et al., *The decline in cancer mortality in the European Union, 1988-1996*. Eur J Cancer, 2000. **36**(15): p. 1965-8.
53. La Vecchia, C., et al., *Trends of cancer mortality in Europe, 1955-1989: I, Digestive sites*. Eur J Cancer, 1992. **28**(1): p. 132-235.
54. Verdecchia, A., et al., *Explaining gastric cancer survival differences among European countries*. Int J Cancer, 2004. **109**(5): p. 737-41.
55. Fielding, J.W.L., J. Powell, and W.H. Allum, *Cancer of the stomach*. 1989, London: The Macmillan Press.
56. Verdecchia, A., et al., *Recent cancer survival in Europe: a 2000-02 period analysis of EUROCARE-4 data*. Lancet Oncol, 2007. **8**(9): p. 784-96.
57. Verdecchia, A., et al., *Comparison of stomach cancer incidence and survival in four continents*. Eur J Cancer, 2003. **39**(11): p. 1603-9.
58. Kolonel, L.N., et al., *Association of diet and place of birth with stomach cancer incidence in Hawaii Japanese and Caucasians*. Am J Clin Nutr, 1981. **34**(11): p. 2478-85.
59. McMichael, A.J., et al., *Patterns of gastro-intestinal cancer in European migrants to Australia: the role of dietary change*. Int J Cancer, 1980. **25**(4): p. 431-7.
60. Coggon, D., C. Osmond, and D.J. Barker, *Stomach cancer and migration within England and Wales*. Br J Cancer, 1990. **61**(4): p. 573-4.
61. WCRF & AICR, *Food, nutrition, physical activity and the prevention of cancer: a global perspective*. , AICR, Editor. 2007: Washington, DC
62. Palli, D., *Epidemiology of gastric cancer: an evaluation of available evidence*. J Gastroenterol, 2000. **35 Suppl 12**: p. 84-9.
63. Gonzalez, C.A., et al., *Smoking and the risk of gastric cancer in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC)*. Int J Cancer, 2003. **107**(4): p. 629-34.
64. Sjødahl, K., et al., *Smoking and alcohol drinking in relation to risk of gastric cancer: a population-based, prospective cohort study*. Int J Cancer, 2007. **120**(1): p. 128-32.
65. Parsonnet, J., et al., *Helicobacter pylori infection and the risk of gastric carcinoma*. N Engl J Med, 1991. **325**(16): p. 1127-31.
66. Forman, D., et al., *Association between infection with Helicobacter pylori and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation*. BMJ, 1991. **302**(6788): p. 1302-5.
67. Nomura, A., et al., *Helicobacter pylori infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii*. N Engl J Med, 1991. **325**(16): p. 1132-6.
68. EUROGAST Study Group, *An international association between Helicobacter pylori infection and gastric cancer. The EUROGAST Study Group*. Lancet, 1993. **341**(8857): p. 1359-62.
69. Helicobacter and Cancer Collaborative Group, *Gastric cancer and Helicobacter pylori: a combined analysis of 12 case control studies nested within prospective cohorts*. Gut, 2001. **49**(3): p. 347-53.
70. Correa, P., *Helicobacter pylori and gastric cancer: state of the art*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1996. **5**(6): p. 477-81.
71. Tomb, J.F., et al., *The complete genome sequence of the gastric pathogen Helicobacter pylori*. Nature, 1997. **388**(6642): p. 539-47.
72. Alm, R.A., et al., *Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen Helicobacter pylori*. Nature, 1999. **397**(6715): p. 176-80.
73. Kuipers, E.J., et al., *Helicobacter pylori and atrophic gastritis: importance of the cagA status*. J Natl Cancer Inst, 1995. **87**(23): p. 1777-80.



74. Blaser, M.J., et al., *Infection with Helicobacter pylori strains possessing cagA is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach*. Cancer Res, 1995. **55**(10): p. 2111-5.
75. Parsonnet, J., et al., *Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative Helicobacter pylori infection*. Gut, 1997. **40**(3): p. 297-301.
76. Huang, J.Q., et al., *Meta-analysis of the relationship between cagA seropositivity and gastric cancer*. Gastroenterology, 2003. **125**(6): p. 1636-44.
77. Vicari, J.J., et al., *The seroprevalence of cagA-positive Helicobacter pylori strains in the spectrum of gastroesophageal reflux disease*. Gastroenterology, 1998. **115**(1): p. 50-7.
78. Ito, Y., et al., *Analysis and typing of the vacA gene from cagA-positive strains of Helicobacter pylori isolated in Japan*. J Clin Microbiol, 1997. **35**(7): p. 1710-4.
79. Azuma, T., et al., *Correlation between variation of the 3' region of the cagA gene in Helicobacter pylori and disease outcome in Japan*. J Infect Dis, 2002. **186**(11): p. 1621-30.
80. El-Omar, E.M., et al., *Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms*. Gastroenterology, 2003. **124**(5): p. 1193-201.
81. El-Omar, E.M., et al., *Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer*. Nature, 2000. **404**(6776): p. 398-402.
82. Buckley, M.J., et al., *A community-based study of the epidemiology of Helicobacter pylori infection and associated asymptomatic gastroduodenal pathology*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 1998. **10**(5): p. 375-9.
83. Webb, P.M., et al., *Relation between infection with Helicobacter pylori and living conditions in childhood: evidence for person to person transmission in early life*. BMJ, 1994. **308**(6931): p. 750-3.
84. Kurosawa, M., et al., *Helicobacter pylori infection among Japanese children*. J Gastroenterol Hepatol, 2000. **15**(12): p. 1382-5.
85. Olmos, J.A., H. Rios, and R. Higa, *Prevalence of Helicobacter pylori infection in Argentina: results of a nationwide epidemiologic study*. Argentinean Hp Epidemiologic Study Group. J Clin Gastroenterol, 2000. **31**(1): p. 33-7.
86. Goodman, K.J. and P. Correa, *Transmission of Helicobacter pylori among siblings*. Lancet, 2000. **355**(9201): p. 358-62.
87. Sitas, F., J. Yarnell, and D. Forman, *Helicobacter pylori infection rates in relation to age and social class in a population of Welsh men*. Gut, 1992. **33**(11): p. 1582.
88. Parsonnet, J., *The incidence of Helicobacter pylori infection*. Aliment Pharmacol Ther, 1995. **9 Suppl 2**: p. 45-51.
89. Eslick, G.D., *Helicobacter pylori infection causes gastric cancer? A review of the epidemiological, meta-analytic, and experimental evidence*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(19): p. 2991-9.
90. Laheij, R.J., et al., *Mortality trend from cancer of the gastric cardia in The Netherlands, 1969-1994*. Int J Epidemiol, 1999. **28**(3): p. 391-5.
91. Barber, M., R.C. Fitzgerald, and C. Caldas, *Familial gastric cancer - aetiology and pathogenesis*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2006. **20**(4): p. 721-34.
92. Palli, D., et al., *Family history and risk of stomach cancer in Italy*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1994. **3**(1): p. 15-8.
93. La Vecchia, C., et al., *Family history and the risk of stomach and colorectal cancer*. Cancer, 1992. **70**(1): p. 50-5.
94. Lissowska, J., et al., *Family history and risk of stomach cancer in Warsaw, Poland*. Eur J Cancer Prev, 1999. **8**(3): p. 223-7.
95. Dhillon, P.K., et al., *Family history of cancer and risk of esophageal and gastric cancers in the United States*. Int J Cancer, 2001. **93**(1): p. 148-52.



96. Chow, W.H., et al., *Body mass index and risk of adenocarcinomas of the esophagus and gastric cardia*. J Natl Cancer Inst, 1998. **90**(2): p. 150-5.
97. Vaughan, T.L., et al., *Obesity, alcohol, and tobacco as risk factors for cancers of the esophagus and gastric cardia: adenocarcinoma versus squamous cell carcinoma*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1995. **4**(2): p. 85-92.
98. Clark, G.W., et al., *Is Barrett's metaplasia the source of adenocarcinomas of the cardia?* Arch Surg, 1994. **129**(6): p. 609-14.
99. Ishaq, S. and J.A. Jankowski, *Barrett's metaplasia: clinical implications*. World J Gastroenterol, 2001. **7**(4): p. 563-5.
100. Thompson, D.E., et al., *Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part II: Solid tumors, 1958-1987*. Radiat Res, 1994. **137**(2 Suppl): p. S17-67.
101. Hsing, A.W., et al., *Pernicious anemia and subsequent cancer. A population-based cohort study*. Cancer, 1993. **71**(3): p. 745-50.
102. Aird, I., H.H. Bentall, and J.A. Roberts, *A relationship between cancer of stomach and the ABO blood groups*. Br Med J, 1953. **1**(4814): p. 799-801.
103. Stalnikowicz, R. and J. Benbassat, *Risk of gastric cancer after gastric surgery for benign disorders*. Arch Intern Med, 1990. **150**(10): p. 2022-6.
104. Levine, P.H., et al., *Elevated antibody titers to Epstein-Barr virus prior to the diagnosis of Epstein-Barr-virus-associated gastric adenocarcinoma*. Int J Cancer, 1995. **60**(5): p. 642-4.
105. Uemura, Y., et al., *A unique morphology of Epstein-Barr virus-related early gastric carcinoma*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1994. **3**(7): p. 607-11.
106. Shousha, S. and Y.A. Luqmani, *Epstein-Barr virus in gastric carcinoma and adjacent normal gastric and duodenal mucosa*. J Clin Pathol, 1994. **47**(8): p. 695-8.
107. Hallissey, M.T., et al., *Early detection of gastric cancer*. BMJ, 1990. **301**(6751): p. 513-5.
108. Dooley, C.P., et al., *Double-contrast barium meal and upper gastrointestinal endoscopy. A comparative study*. Ann Intern Med, 1984. **101**(4): p. 538-45.
109. Low, V.H., et al., *Diagnosis of gastric carcinoma: sensitivity of double-contrast barium studies*. AJR Am J Roentgenol, 1994. **162**(2): p. 329-34.
110. Sakita, T., et al., *Observations on the healing of ulcerations in early gastric cancer. The life cycle of the malignant ulcer*. Gastroenterology, 1971. **60**(5): p. 835-9 passim.
111. Kurihara, M., et al., *Diagnosis of small early gastric cancer by X-ray, endoscopy, and biopsy*. Cancer Detect Prev, 1981. **4**(1-4): p. 377-83.
112. Kurtz, R.C. and P. Sherlock, *The diagnosis of gastric cancer*. Semin Oncol, 1985. **12**(1): p. 11-8.
113. Graham, D.Y., et al., *Prospective evaluation of biopsy number in the diagnosis of esophageal and gastric carcinoma*. Gastroenterology, 1982. **82**(2): p. 228-31.
114. Graham, D.Y., et al., *Healing of benign gastric ulcer: comparison of cimetidine and placebo in the United States*. Ann Intern Med, 1985. **102**(5): p. 573-6.
115. Isenberg, J.I., et al., *Healing of benign gastric ulcer with low-dose antacid or cimetidine. A double-blind, randomized, placebo-controlled trial*. N Engl J Med, 1983. **308**(22): p. 1319-24.
116. Levine, M.S., *Peptic ulcers*, in *Textbook of gastrointestinal radiology*, R.M. Gore, M.S. Levine, and I. Laufer, Editors. 1994, Saunders: Philadelphia. p. 562-97.
117. Stadlander, C.T. and J.W. Waterbor, *Molecular epidemiology, pathogenesis and prevention of gastric cancer*. Carcinogenesis, 1999. **20**(12): p. 2195-208.
118. Yasui, W., et al., *Molecular diagnosis of gastric cancer: present and future*. Gastric Cancer, 2001. **4**(3): p. 113-21.
119. Lai, I.R., et al., *Comparison of serum CA72-4, CEA, TPA, CA19-9 and CA125 levels in gastric cancer patients and correlation with recurrence*. Hepatogastroenterology, 2002. **49**(46): p. 1157-60.



120. Hakama, M., et al., *Tumour markers and screening for gastrointestinal cancer: a follow up study in Finland*. J Med Screen, 1994. **1**(1): p. 60-4.
121. Posner, M.R. and R.J. Mayer, *The use of serologic tumor markers in gastrointestinal malignancies*. Hematol Oncol Clin North Am, 1994. **8**(3): p. 533-53.
122. Nakane, Y., et al., *Correlation of preoperative carcinoembryonic antigen levels and prognosis of gastric cancer patients*. Cancer, 1994. **73**(11): p. 2703-8.
123. Pectasides, D., et al., *CEA, CA 19-9, and CA-50 in monitoring gastric carcinoma*. Am J Clin Oncol, 1997. **20**(4): p. 348-53.
124. Hirota, T., S.C. Ming, and M. Itabashhi, *Pathology of early gastric cancer*, in *Gastric cancer*, M. Nishi, H. Ichikawa, and T. Nakajima, Editors. 1993, Springer-Verlag: Tokyo. p. 66-86.
125. Fenoglio-Preiser, C.M., et al., *Pathologic and phenotypic features of gastric cancer*. Semin Oncol, 1996. **23**(3): p. 292-306.
126. White, R.M., et al., *Early gastric cancer. Recent experience*. Radiology, 1985. **155**(1): p. 25-7.
127. Nakajima, T., *Gastric cancer treatment guidelines in Japan*. Gastric Cancer, 2002. **5**(1): p. 1-5.
128. Wang, Y.P., C. Bennett, and T. Pan, *Endoscopic mucosal resection for early gastric cancer*. Cochrane Database Syst Rev, 2006(1): p. CD004276.
129. Kim, J.J., et al., *EMR for early gastric cancer in Korea: a multicenter retrospective study*. Gastrointest Endosc, 2007. **66**(4): p. 693-700.
130. Fukase, K., et al., *Effect of eradication of Helicobacter pylori on incidence of metachronous gastric carcinoma after endoscopic resection of early gastric cancer: an open-label, randomised controlled trial*. Lancet, 2008. **372**(9636): p. 392-7.
131. Gotoda, T., H. Yamamoto, and R.M. Soetikno, *Endoscopic submucosal dissection of early gastric cancer*. J Gastroenterol, 2006. **41**(10): p. 929-42.
132. Oda, I., et al., *A multicenter retrospective study of endoscopic resection for early gastric cancer*. Gastric Cancer, 2006. **9**(4): p. 262-70.
133. Gotoda, T., et al., *Incidence of lymph node metastasis from early gastric cancer: estimation with a large number of cases at two large centers*. Gastric Cancer, 2000. **3**(4): p. 219-225.
134. Yasuda, K., et al., *Rate of detection of lymph node metastasis is correlated with the depth of submucosal invasion in early stage gastric carcinoma*. Cancer, 1999. **85**(10): p. 2119-23.
135. Petrelli, N.J., *The debate is over; it's time to move on*. J Clin Oncol, 2004. **22**(11): p. 2041-2.
136. Cunningham, D. and Y.J. Chua, *East meets west in the treatment of gastric cancer*. N Engl J Med, 2007. **357**(18): p. 1863-5.
137. Adashek, K., J. Sanger, and W.P. Longmire, Jr., *Cancer of the stomach. Review of consecutive ten year intervals*. Ann Surg, 1979. **189**(1): p. 6-10.
138. Landis, S.H., et al., *Cancer statistics, 1998*. CA Cancer J Clin, 1998. **48**(1): p. 6-29.
139. Macdonald, J.S. and S.F. Schnall, *Adjuvant treatment of gastric cancer*. World J Surg, 1995. **19**(2): p. 221-5.
140. Wanebo, H.J., et al., *Cancer of the stomach. A patient care study by the American College of Surgeons*. Ann Surg, 1993. **218**(5): p. 583-92.
141. Wilke, H., et al., *Preoperative chemotherapy for unresectable gastric cancer*. World J Surg, 1995. **19**(2): p. 210-5.
142. Akoh, J.A. and I.M. Macintyre, *Improving survival in gastric cancer: review of 5-year survival rates in English language publications from 1970*. Br J Surg, 1992. **79**(4): p. 293-9.
143. Jatzko, G.R., et al., *A 10-year experience with Japanese-type radical lymph node dissection for gastric cancer outside of Japan*. Cancer, 1995. **76**(8): p. 1302-12.



144. Roder, J.D., et al., *Lymphadenectomy for gastric cancer in clinical trials: update*. World J Surg, 1995. **19**(4): p. 546-53.
145. Hansson, L.E., P. Sparen, and O. Nyren, *Survival in stomach cancer is improving: results of a nationwide population-based Swedish study*. Ann Surg, 1999. **230**(2): p. 162-9.
146. Noguchi, M. and I. Miyazaki, *Prognostic significance and surgical management of lymph node metastasis in gastric cancer*. Br J Surg, 1996. **83**(2): p. 156-61.
147. Otsuji, E., et al., *Recent advances in surgical treatment have improved the survival of patients with gastric carcinoma*. Cancer, 1998. **82**(7): p. 1233-7.
148. Sasako, M., *Principles of surgical treatment for curable gastric cancer*. J Clin Oncol, 2003. **21**(23 Suppl): p. 274s-275s.
149. Fuchs, C.S. and R.J. Mayer, *Gastric carcinoma*. N Engl J Med, 1995. **333**(1): p. 32-41.
150. Maruyama, K., K. Okabayashi, and T. Kinoshita, *Progress in gastric cancer surgery in Japan and its limits of radicality*. World J Surg, 1987. **11**(4): p. 418-25.
151. Davis, P.A. and T. Sano, *The difference in gastric cancer between Japan, USA and Europe: what are the facts? what are the suggestions?* Crit Rev Oncol Hematol, 2001. **40**(1): p. 77-94.
152. McCulloch, P., *Gastric cancer*. Postgrad Med J, 1996. **72**(850): p. 450-7.
153. Hundahl, S.A., J.L. Phillips, and H.R. Menck, *The National Cancer Data Base Report on poor survival of U.S. gastric carcinoma patients treated with gastrectomy: Fifth Edition American Joint Committee on Cancer staging, proximal disease, and the "different disease" hypothesis*. Cancer, 2000. **88**(4): p. 921-32.
154. Bonenkamp, J.J., et al., *Comparison of factors influencing the prognosis of Japanese, German, and Dutch gastric cancer patients*. World J Surg, 1993. **17**(3): p. 410-4; discussion 415.
155. Wu, C.W., et al., *Nodal dissection for patients with gastric cancer: a randomised controlled trial*. Lancet Oncol, 2006. **7**(4): p. 309-15.
156. Hartgrink, H.H., et al., *Gastric cancer*. Lancet, 2009. **374**(9688): p. 477-90.
157. Halm, E.A., C. Lee, and M.R. Chassin, *Is volume related to outcome in health care? A systematic review and methodologic critique of the literature*. Ann Intern Med, 2002. **137**(6): p. 511-20.
158. Birkmeyer, J.D., et al., *Hospital volume and late survival after cancer surgery*. Ann Surg, 2007. **245**(5): p. 777-83.
159. Damhuis, R.A., et al., *Hospital volume and post-operative mortality after resection for gastric cancer*. Eur J Surg Oncol, 2002. **28**(4): p. 401-5.
160. Thompson, A.M., et al., *Hospital volume does not influence long-term survival of patients undergoing surgery for oesophageal or gastric cancer*. Br J Surg, 2007. **94**(5): p. 578-84.
161. Wenner, J., et al., *The influence of surgical volume on hospital mortality and 5-year survival for carcinoma of the oesophagus and gastric cardia*. Anticancer Res, 2005. **25**(1B): p. 419-24.
162. Xirasagar, S., et al., *Procedure volume of gastric cancer resections versus 5-year survival*. Eur J Surg Oncol, 2008. **34**(1): p. 23-9.
163. Grundmann, R.T., et al., *[Diagnosis of and therapy for gastric cancer--work-flow]*. Zentralbl Chir, 2009. **134**(4): p. 362-74.
164. Maruyama, K., et al., *Lymph node metastases of gastric cancer. General pattern in 1931 patients*. Ann Surg, 1989. **210**(5): p. 596-602.
165. Noguchi, Y., et al., *Radical surgery for gastric cancer. A review of the Japanese experience*. Cancer, 1989. **64**(10): p. 2053-62.
166. Noguchi, Y., et al., *Is gastric carcinoma different between Japan and the United States?* Cancer, 2000. **89**(11): p. 2237-46.
167. Ohta, H., et al., *Early gastric carcinoma with special reference to macroscopic classification*. Cancer, 1987. **60**(5): p. 1099-106.



168. Schlemper, R.J., et al., *Differences in diagnostic criteria for gastric carcinoma between Japanese and western pathologists*. Lancet, 1997. **349**(9067): p. 1725-9.
169. Everett, S.M. and A.T. Axon, *Early gastric cancer in Europe*. Gut, 1997. **41**(2): p. 142-50.
170. Bunt, A.M., et al., *Surgical/pathologic-stage migration confounds comparisons of gastric cancer survival rates between Japan and Western countries*. J Clin Oncol, 1995. **13**(1): p. 19-25.
171. Kodama, Y., et al., *Evaluation of extensive lymph node dissection for carcinoma of the stomach*. World J Surg, 1981. **5**(2): p. 241-8.
172. Lee, H.K., et al., *Influence of the number of lymph nodes examined on staging of gastric cancer*. Br J Surg, 2001. **88**(10): p. 1408-12.
173. Noda, N., et al., *Ignoring small lymph nodes can be a major cause of staging error in gastric cancer*. Br J Surg, 1998. **85**(6): p. 831-4.
174. Allgayer, H., M.M. Heiss, and F.W. Schildberg, *Prognostic factors in gastric cancer*. Br J Surg, 1997. **84**(12): p. 1651-64.
175. International Union Against Cancer (UICC), in *TNM Classification of Malignant Tumours, 7th ed.*, L.H. Sobin, M.K. Gospodarowicz, and C. Wittekind, Editors. 2009, Wiley-Blackwell: New York.
176. Edge, S.B., et al., in *American Joint Committee on Cancer (AJCC) cancer staging manual, 7th ed.* 2010, Springer: Chicago.
177. Hermanel, P., et al., *Prognostic factors in cancer*. 1995, Berlin: Springer.
178. Siewert, J.R., et al., *Palliative treatment from the surgical point of view*, in *Gastric Cancer*, M.I.H. Nishi, et al., Editors. 1993, Springer: Berlin. p. 378-92.
179. Roder, J.D., et al., *Prognostic factors in gastric carcinoma. Results of the German Gastric Carcinoma Study 1992*. Cancer, 1993. **72**(7): p. 2089-97.
180. Siewert, J.R., et al., *Relevant prognostic factors in gastric cancer: ten-year results of the German Gastric Cancer Study*. Ann Surg, 1998. **228**(4): p. 449-61.
181. Takagane, A., et al., *Evaluation of the ratio of lymph node metastasis as a prognostic factor in patients with gastric cancer*. Gastric Cancer, 1999. **2**(2): p. 122-128.
182. Inoue, K., et al., *The superiority of ratio-based lymph node staging in gastric carcinoma*. Ann Surg Oncol, 2002. **9**(1): p. 27-34.
183. Takeuchi, H. and Y. Kitagawa, *Is lymphadenectomy a predictor or savior for patients with gastric cancer?* Ann Surg Oncol, 2010. **17**(5): p. 1257-8.
184. Maduekwe, U.N., et al., *New metastatic lymph node ratio system reduces stage migration in patients undergoing D1 lymphadenectomy for gastric adenocarcinoma*. Ann Surg Oncol, 2010. **17**(5): p. 1267-77.
185. Bando, E., et al., *Outcome of ratio of lymph node metastasis in gastric carcinoma*. Ann Surg Oncol, 2002. **9**(8): p. 775-84.
186. Xu, D.Z., et al., *Positive lymph node ratio is an independent prognostic factor in gastric cancer after d2 resection regardless of the examined number of lymph nodes*. Ann Surg Oncol, 2009. **16**(2): p. 319-26.
187. Fukuda, N., et al., *Prognostic significance of the metastatic lymph node ratio in gastric cancer patients*. World J Surg, 2009. **33**(11): p. 2378-82.
188. Sun, Z., et al., *The impact of N-ratio in minimizing stage migration phenomenon in gastric cancer patients with insufficient number or level of lymph node retrieved: results from a Chinese mono-institutional study in 2159 patients*. Ann Oncol, 2009. **20**(5): p. 897-905.
189. Moriguchi, S., et al., *Relationship between age and the time of surgery and prognosis after gastrectomy for gastric cancer*. J Surg Oncol, 1993. **52**(2): p. 119-23.
190. Lo, S.S., et al., *Poorer prognosis in young patients with gastric cancer?* Hepatogastroenterology, 1999. **46**(28): p. 2690-3.
191. Catalano, V., et al., *Gastric cancer*. Crit Rev Oncol Hematol, 2005. **54**(3): p. 209-41.



192. Maguire, A., et al., *Sex as a prognostic factor in gastric cancer*. Eur J Cancer, 1996. **32A**(8): p. 1303-9.
193. Maehara, Y., et al., *Prognosis for surgically treated gastric cancer patients is poorer for women than men in all patients under age 50*. Br J Cancer, 1992. **65**(3): p. 417-20.
194. van Krieken, J.H., M. Sasako, and C.J. van de velde, *Gastric cancer*, in *Prognostic factors in cancer*, M.K. Gospodarowicz, et al., Editors. 2001, Wiley-Liss: New York. p. 251-65.
195. Rohde, H., et al., *Proximal compared with distal adenocarcinoma of the stomach: differences and consequences*. German Gastric Cancer TNM Study Group. Br J Surg, 1991. **78**(10): p. 1242-8.
196. Preto, J.R., et al., *A invasão venosa e a influência no prognóstico do carcinoma gástrico*. Arq Port Cirurgia, 2001. **10**: p. 80-8
197. Ikeguchi, M., et al., *Relationship between hematogenic metastasis of gastric cancer and the maximum extent of venous invasion by cancer cells in the gastric wall*. Hepatogastroenterology, 1995. **42**(5): p. 660-5.
198. Bunt, A.M., et al., *Lymph node staging standards in gastric cancer*. J Clin Oncol, 1995. **13**(9): p. 2309-16.
199. Kikuchi, S., et al., *Tumor volume: a novel prognostic factor in patients who undergo curative resection for gastric cancer*. Langenbecks Arch Surg, 2000. **385**(3): p. 225-8.
200. Kim, S.H., et al., *Effect of microscopic resection line disease on gastric cancer survival*. J Gastrointest Surg, 1999. **3**(1): p. 24-33.
201. Hartgrink, H.H., H.J. Bonenkamp, and C.J. van de Velde, *Influence of surgery on outcomes in gastric cancer*. Surg Oncol Clin N Am, 2000. **9**(1): p. 97-117, vii-viii.
202. Songun, I., et al., *Prognostic value of resection-line involvement in patients undergoing curative resections for gastric cancer*. Eur J Cancer, 1996. **32A**(3): p. 433-7.
203. Fujimoto, S., et al., *Clinicopathologic characteristics of gastric cancer patients with cancer infiltration at surgical margin at gastrectomy*. Anticancer Res, 1997. **17**(1B): p. 689-94.
204. British Stomach Cancer Group, *Resection line disease in stomach cancer*. Br Med J (Clin Res Ed), 1984. **289**(6445): p. 601-3.
205. Tachibana, M., et al., *Serum carcinoembryonic antigen as a prognostic factor in resectable gastric cancer*. J Am Coll Surg, 1998. **187**(1): p. 64-8.
206. Sakamoto, J., et al., *Association between preoperative plasma CEA levels and the prognosis of gastric cancer following curative resection*. Tumor Marker Committee, Japanese Foundation for Multidisciplinary Treatment of Cancer, Tokyo, Japan. Surg Oncol, 1996. **5**(3): p. 133-9.
207. Maehara, Y., et al., *Predictive value of preoperative carcinoembryonic antigen levels for the prognosis of patients with well-differentiated gastric cancer. A multivariate analysis*. Oncology, 1994. **51**(3): p. 234-7.
208. Irinoda, T., et al., *Carcinoembryonic antigen level in peritoneal washing is a prognostic factor in patients with gastric cancer*. Oncol Rep, 1998. **5**(3): p. 661-6.
209. Nishiyama, M., et al., *Carcinoembryonic antigen levels in the peritoneal cavity: useful guide to peritoneal recurrence and prognosis for gastric cancer*. World J Surg, 1995. **19**(1): p. 133-7; discussion 137.
210. Ming, S.C., *Gastric carcinoma. A pathobiological classification*. Cancer, 1977. **39**(6): p. 2475-85.
211. Borrmann, R., *Geschwulste des magens and duodenums*, in *Handbuch der speziellen pathologischen anatomie and histologie*, F. Henke and O. Lubarsch, Editors. 1926, Springer-Verlag: Berlin. p. 865.
212. Carneiro, F., M. Seixas, and M. Sobrinho-Simoes, *New elements for an updated classification of the carcinomas of the stomach*. Pathol Res Pract, 1995. **191**(6): p. 571-84.



213. Rohde, H., et al., *Has there been any improvement in the staging of gastric cancer? Findings from the German Gastric Cancer TNM Study Group*. Cancer, 1989. **64**(12): p. 2465-81.
214. Carriaga, M.T. and D.E. Henson, *The histologic grading of cancer*. Cancer, 1995. **75**(1 Suppl): p. 406-21.
215. Ribeiro, M.M., et al., *Prognostic significance of Lauren and Ming classifications and other pathologic parameters in gastric carcinoma*. Cancer, 1981. **47**(4): p. 780-4.
216. Cimerman, M., et al., *Comparison of Lauren's, Ming's and WHO histological classifications of gastric cancer as a prognostic factor for operated patients*. Int Surg, 1994. **79**(1): p. 27-32.
217. Luebke, T., et al., *Histological grading in gastric cancer by Ming classification: correlation with histopathological subtypes, metastasis, and prognosis*. World J Surg, 2005. **29**(11): p. 1422-7; discussion 1428.
218. Lee, K.H., et al., *A prospective correlation of Lauren's histological classification of stomach cancer with clinicopathological findings including DNA flow cytometry*. Pathol Res Pract, 2001. **197**(4): p. 223-9.
219. Maehara, Y., et al., *Time trends of surgical treatment and the prognosis for Japanese patients with gastric cancer*. Br J Cancer, 2000. **83**(8): p. 986-91.
220. Becker, K.F., G. Keller, and H. Hoefler, *The use of molecular biology in diagnosis and prognosis of gastric cancer*. Surg Oncol, 2000. **9**(1): p. 5-11.
221. Yasui, W., et al., *Molecular-pathological prognostic factors of gastric cancer: a review*. Gastric Cancer, 2005. **8**(2): p. 86-94.
222. Pinto-de-Sousa, J., et al., *Mucins MUC1, MUC2, MUC5AC and MUC6 expression in the evaluation of differentiation and clinico-biological behaviour of gastric carcinoma*. Virchows Arch, 2002. **440**(3): p. 304-10.
223. Lee, H.S., et al., *MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6 expressions in gastric carcinomas: their roles as prognostic indicators*. Cancer, 2001. **92**(6): p. 1427-34.
224. Akyurek, N., et al., *Expression of MUC1 and MUC2 mucins in gastric carcinomas: their relationship with clinicopathologic parameters and prognosis*. Pathol Res Pract, 2002. **198**(10): p. 665-74.
225. Kocer, B., et al., *Prognostic significance of mucin expression in gastric carcinoma*. Dig Dis Sci, 2004. **49**(6): p. 954-64.
226. Reis, C.A., et al., *Immunohistochemical study of the expression of MUC6 mucin and co-expression of other secreted mucins (MUC5AC and MUC2) in human gastric carcinomas*. J Histochem Cytochem, 2000. **48**(3): p. 377-88.
227. Baldus, S.E., et al., *Correlation of MUC5AC immunoreactivity with histopathological subtypes and prognosis of gastric carcinoma*. Ann Surg Oncol, 2002. **9**(9): p. 887-93.
228. Coussens, L., et al., *Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene*. Science, 1985. **230**(4730): p. 1132-9.
229. Popescu, N.C., C.R. King, and M.H. Kraus, *Localization of the human erbB-2 gene on normal and rearranged chromosomes 17 to bands q12-21.32*. Genomics, 1989. **4**(3): p. 362-6.
230. Schechter, A.L., et al., *The neu gene: an erbB-homologous gene distinct from and unlinked to the gene encoding the EGF receptor*. Science, 1985. **229**(4717): p. 976-8.
231. Akiyama, T., et al., *The product of the human c-erbB-2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity*. Science, 1986. **232**(4758): p. 1644-6.
232. Yokota, J., et al., *Amplification of c-erbB-2 oncogene in human adenocarcinomas in vivo*. Lancet, 1986. **1**(8484): p. 765-7.
233. King, C.R., M.H. Kraus, and S.A. Aaronson, *Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma*. Science, 1985. **229**(4717): p. 974-6.
234. Gurel, S., et al., *The relationship between c-erbB-2 oncogene expression and clinicopathological factors in gastric cancer*. J Int Med Res, 1999. **27**(2): p. 74-8.



235. Amadori, D., et al., *Gene amplification and proliferative kinetics in relation to prognosis of patients with gastric carcinoma*. Cancer, 1997. **79**(2): p. 226-32.
236. Sasano, H., et al., *Double immunostaining for c-erbB-2 and p53 in human stomach cancer cells*. Hum Pathol, 1993. **24**(6): p. 584-9.
237. Tateishi, M., et al., *Clinicopathological significance of c-erbB-2 protein expression in human gastric carcinoma*. J Surg Oncol, 1992. **49**(4): p. 209-12.
238. Tanner, M., et al., *Amplification of HER-2 in gastric carcinoma: association with Topoisomerase IIalpha gene amplification, intestinal type, poor prognosis and sensitivity to trastuzumab*. Ann Oncol, 2005. **16**(2): p. 273-8.
239. Garcia, I., et al., *Clinical significance of the epidermal growth factor receptor and HER2 receptor in resectable gastric cancer*. Ann Surg Oncol, 2003. **10**(3): p. 234-41.
240. Nakajima, M., et al., *The prognostic significance of amplification and overexpression of c-met and c-erb B-2 in human gastric carcinomas*. Cancer, 1999. **85**(9): p. 1894-902.
241. Mizutani, T., et al., *Relationship of C-erbB-2 protein expression and gene amplification to invasion and metastasis in human gastric cancer*. Cancer, 1993. **72**(7): p. 2083-8.
242. Uchino, S., et al., *Overexpression of c-erbB-2 protein in gastric cancer. Its correlation with long-term survival of patients*. Cancer, 1993. **72**(11): p. 3179-84.
243. Park, D.I., et al., *HER-2/neu amplification is an independent prognostic factor in gastric cancer*. Dig Dis Sci, 2006. **51**(8): p. 1371-9.
244. Allgayer, H., et al., *c-erbB-2 is of independent prognostic relevance in gastric cancer and is associated with the expression of tumor-associated protease systems*. J Clin Oncol, 2000. **18**(11): p. 2201-9.
245. Yonemura, Y., et al., *Evaluation of immunoreactivity for erbB-2 protein as a marker of poor short term prognosis in gastric cancer*. Cancer Res, 1991. **51**(3): p. 1034-8.
246. Tsugawa, K., et al., *Amplification of the c-met, c-erbB-2 and epidermal growth factor receptor gene in human gastric cancers: correlation to clinical features*. Oncology, 1998. **55**(5): p. 475-81.
247. Orita, H., et al., *c-erbB-2 expression is predictive for lymphatic spread of clinical gastric carcinoma*. Hepatogastroenterology, 1997. **44**(13): p. 294-8.
248. Pinto-de-Sousa, J., et al., *c-erb B-2 expression is associated with tumor location and venous invasion and influences survival of patients with gastric carcinoma*. Int J Surg Pathol, 2002. **10**(4): p. 247-56.
249. Roukos, D.H., *Targeting gastric cancer with trastuzumab: new clinical practice and innovative developments to overcome resistance*. Ann Surg Oncol, 2010. **17**(1): p. 14-7.
250. Barros-Silva, J.D., et al., *Association of ERBB2 gene status with histopathological parameters and disease-specific survival in gastric carcinoma patients*. Br J Cancer, 2009. **100**(3): p. 487-93.
251. Gravalos, C. and A. Jimeno, *HER2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target*. Ann Oncol, 2008. **19**(9): p. 1523-9.
252. David, L., et al., *c-erbB-2 expression in primary gastric carcinomas and their metastases*. Mod Pathol, 1992. **5**(4): p. 384-90.
253. Steele, R.J., et al., *The p53 tumour suppressor gene*. Br J Surg, 1998. **85**(11): p. 1460-7.
254. Fenoglio-Preiser, C.M., et al., *TP53 and gastric carcinoma: a review*. Hum Mutat, 2003. **21**(3): p. 258-70.
255. Yamada, Y., et al., *p53 gene mutations in gastric cancer metastases and in gastric cancer cell lines derived from metastases*. Cancer Res, 1991. **51**(21): p. 5800-5.
256. Correa, P. and Y.H. Shiao, *Phenotypic and genotypic events in gastric carcinogenesis*. Cancer Res, 1994. **54**(7 Suppl): p. 1941s-1943s.
257. Ireland, A.P., G.W. Clark, and T.R. DeMeester, *Barrett's esophagus. The significance of p53 in clinical practice*. Ann Surg, 1997. **225**(1): p. 17-30.
258. Yao, J., H.S. Goh, and D.R. Smith, *p53 mutations in primary colorectal adenocarcinomas and liver metastases*. Br J Surg, 1996. **83**(9): p. 1245-6.



259. Wong, S.K., et al., *Mutant plasma p53 protein levels: prognostication in colorectal carcinoma*. Br J Surg, 1997. **84**(5): p. 664-5.
260. Reed, W., et al., *The prognostic value of p53 and c-erb B-2 immunostaining is overrated for patients with lymph node negative breast carcinoma: a multivariate analysis of prognostic factors in 613 patients with a follow-up of 14-30 years*. Cancer, 2000. **88**(4): p. 804-13.
261. Sarbia, M., et al., *p53 protein expression and prognosis in squamous cell carcinoma of the esophagus*. Cancer, 1994. **74**(8): p. 2218-23.
262. Hashimoto, N., et al., *Expression of p53 and RB proteins in squamous cell carcinoma of the esophagus: their relationship with clinicopathologic characteristics*. Ann Surg Oncol, 1999. **6**(5): p. 489-94.
263. Maehara, Y., et al., *Prognostic value of p53 protein expression for patients with gastric cancer--a multivariate analysis*. Br J Cancer, 1999. **79**(7-8): p. 1255-61.
264. Maehara, Y., et al., *Clinical implications of serum anti-p53 antibodies for patients with gastric carcinoma*. Cancer, 1999. **85**(2): p. 302-8.
265. Seruca, R., et al., *P53 mutations in gastric carcinomas*. Br J Cancer, 1992. **65**(5): p. 708-10.
266. Gurel, S., et al., *Expression of p53 protein and prognosis in gastric carcinoma*. J Int Med Res, 1999. **27**(2): p. 85-9.
267. Tahara, E., S. Semba, and H. Tahara, *Molecular biological observations in gastric cancer*. Semin Oncol, 1996. **23**(3): p. 307-15.
268. Kubicka, S., et al., *p53 mutation pattern and expression of c-erbB2 and c-met in gastric cancer: relation to histological subtypes, Helicobacter pylori infection, and prognosis*. Dig Dis Sci, 2002. **47**(1): p. 114-21.
269. Maeda, K., et al., *Expression of p53 and vascular endothelial growth factor associated with tumor angiogenesis and prognosis in gastric cancer*. Oncology, 1998. **55**(6): p. 594-9.
270. Fonseca, L., et al., *p53 detection as a prognostic factor in early gastric cancer*. Oncology, 1994. **51**(6): p. 485-90.
271. Victorzon, M., et al., *Expression of p53 protein as a prognostic factor in patients with gastric cancer*. Eur J Cancer, 1996. **32A**(2): p. 215-20.
272. Ichiyoshi, Y., et al., *Overexpression of p53 is associated with growth pattern and prognosis in advanced gastric cancer*. Hepatogastroenterology, 1997. **44**(14): p. 546-53.
273. Xiangming, C., et al., *p21 expression is a prognostic factor in patients with p53-negative gastric cancer*. Cancer Lett, 2000. **148**(2): p. 181-8.
274. Jonjic, N., et al., *Epidermal growth factor-receptor expression correlates with tumor cell proliferation and prognosis in gastric cancer*. Anticancer Res, 1997. **17**(5B): p. 3883-8.
275. Takano, Y., et al., *Cyclin D2 overexpression and lack of p27 correlate positively and cyclin E inversely with a poor prognosis in gastric cancer cases*. Am J Pathol, 2000. **156**(2): p. 585-94.
276. Wu, M.S., et al., *Alterations of BAT-26 identify a subset of gastric cancer with distinct clinicopathologic features and better postoperative prognosis*. Hepatogastroenterology, 2002. **49**(43): p. 285-9.
277. Nekarda, H., et al., *Prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in completely resected gastric cancer*. Cancer Res, 1994. **54**(11): p. 2900-7.
278. Okusa, Y., T. Ichikura, and H. Mochizuki, *Prognostic impact of stromal cell-derived urokinase-type plasminogen activator in gastric carcinoma*. Cancer, 1999. **85**(5): p. 1033-8.
279. Saito, H., et al., *Serum level of a soluble receptor for interleukin-2 as a prognostic factor in patients with gastric cancer*. Oncology, 1999. **56**(3): p. 253-8.



280. Maeta, M., et al., *A progressive postoperative increase in the serum level of soluble receptors for interleukin-2 is an indicator of a poor prognosis in patients with gastric cancer*. *Int J Mol Med*, 1998. **1**(1): p. 113-6.
281. Kikuyama, S., et al., *Ki-67 antigen expression in relation to clinicopathological variables and prognosis in gastric cancer*. *Oncol Rep*, 1998. **5**(4): p. 867-70.
282. Rugge, M., et al., *Pathology and ploidy in the prognosis of gastric cancer with no extranodal metastasis*. *Cancer*, 1994. **73**(4): p. 1127-33.
283. Yonemura, Y., et al., *Prediction of lymph node metastasis and prognosis from the assay of the expression of proliferating cell nuclear antigen and DNA ploidy in gastric cancer*. *Oncology*, 1994. **51**(3): p. 251-7.
284. Kimura, H. and Y. Yonemura, *Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in advanced gastric cancer and its relationship with prognosis*. *Cancer*, 1991. **67**(10): p. 2588-93.
285. Abad, M., et al., *DNA aneuploidy by flow cytometry is an independent prognostic factor in gastric cancer*. *Anal Cell Pathol*, 1998. **16**(4): p. 223-31.
286. Sendler, A., et al., *Proliferation kinetics and prognosis in gastric cancer after resection*. *Eur J Cancer*, 2001. **37**(13): p. 1635-41.
287. Catalano, V., et al., *Molecular markers predictive of response to chemotherapy in gastrointestinal tumors*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2001. **38**(2): p. 93-104.
288. Cascinu, S., et al., *Expression of p53 protein and resistance to preoperative chemotherapy in locally advanced gastric carcinoma*. *Cancer*, 1998. **83**(9): p. 1917-22.
289. Nakata, B., et al., *p53 protein overexpression as a predictor of the response to chemotherapy in gastric cancer*. *Surg Today*, 1998. **28**(6): p. 595-8.
290. Lenz, H.J., et al., *Thymidylate synthase mRNA level in adenocarcinoma of the stomach: a predictor for primary tumor response and overall survival*. *J Clin Oncol*, 1996. **14**(1): p. 176-82.
291. Yeh, K.H., et al., *High expression of thymidylate synthase is associated with the drug resistance of gastric carcinoma to high dose 5-fluorouracil-based systemic chemotherapy*. *Cancer*, 1998. **82**(9): p. 1626-31.
292. Allum, W.H., et al., *Gastric cancer: a 25-year review*. *Br J Surg*, 1989. **76**(6): p. 535-40.
293. Lew, J. and M. Posner, *Surgical treatment of localized gastric cancer*, in *Cancer of the upper gastrointestinal tract*, M.V.E. Posner and R. Weichselbaum, Editors. 2002, BC Decker Inc: Hamilton. p. 252-77.
294. Wu, C.W., et al., *Incidence and factors associated with recurrence patterns after intended curative surgery for gastric cancer*. *World J Surg*, 2003. **27**(2): p. 153-8.
295. Shiraishi, N., et al., *Early and late recurrence after gastrectomy for gastric carcinoma. Univariate and multivariate analyses*. *Cancer*, 2000. **89**(2): p. 255-61.
296. Gunderson, L.L. and H. Sosin, *Adenocarcinoma of the stomach: areas of failure in a re-operation series (second or symptomatic look) clinicopathologic correlation and implications for adjuvant therapy*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1982. **8**(1): p. 1-11.
297. Allum, W.H., M.T. Hallissey, and K.A. Kelly, *Adjuvant chemotherapy in operable gastric cancer. 5 year follow-up of first British Stomach Cancer Group trial*. *Lancet*, 1989. **1**(8638): p. 571-4.
298. Marrelli, D., et al., *Different patterns of recurrence in gastric cancer depending on Lauren's histological type: longitudinal study*. *World J Surg*, 2002. **26**(9): p. 1160-5.
299. Landry, J., et al., *Patterns of failure following curative resection of gastric carcinoma*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1990. **19**(6): p. 1357-62.
300. Sue-Ling, H.M., et al., *Gastric cancer: a curable disease in Britain*. *BMJ*, 1993. **307**(6904): p. 591-6.
301. Moriguchi, S., et al., *Risk factors which predict pattern of recurrence after curative surgery for patients with advanced gastric cancer*. *Surg Oncol*, 1992. **1**(5): p. 341-6.



302. Ikeda, Y., et al., *Effective follow-up for recurrence or a second primary cancer in patients with early gastric cancer*. Br J Surg, 2005. **92**(2): p. 235-9.
303. Yoo, C.H., et al., *Recurrence following curative resection for gastric carcinoma*. Br J Surg, 2000. **87**(2): p. 236-42.
304. Parkin, D.M., *Global cancer statistics in the year 2000*. Lancet Oncol, 2001. **2**(9): p. 533-43.
305. Kamangar, F., G.M. Dores, and W.F. Anderson, *Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world*. J Clin Oncol, 2006. **24**(14): p. 2137-50.
306. Miki, K., *Gastric cancer screening using the serum pepsinogen test method*. Gastric Cancer, 2006. **9**(4): p. 245-53.
307. Dinis-Ribeiro, M., et al., *Meta-analysis on the validity of pepsinogen test for gastric carcinoma, dysplasia or chronic atrophic gastritis screening*. J Med Screen, 2004. **11**(3): p. 141-7.
308. Faivre, J., et al., *Survival of patients with oesophageal and gastric cancers in Europe. EURO CARE Working Group*. Eur J Cancer, 1998. **34**(14 Spec No): p. 2167-75.
309. De Vries, A.C. and E.J. Kuipers, *Review article: Helicobacter pylori eradication for the prevention of gastric cancer*. Aliment Pharmacol Ther, 2007. **26** Suppl 2: p. 25-35.
310. Ho, S.B., et al., *Mucin gene expression in normal, preneoplastic, and neoplastic human gastric epithelium*. Cancer Res, 1995. **55**(12): p. 2681-90.
311. Ho, S.B., et al., *Heterogeneity of mucin gene expression in normal and neoplastic tissues*. Cancer Res, 1993. **53**(3): p. 641-51.
312. Reis, C.A., et al., *Expression of fully and under-glycosylated forms of MUC1 mucin in gastric carcinoma*. Int J Cancer, 1998. **79**(4): p. 402-10.
313. Reis, C.A., et al., *Immunohistochemical study of MUC5AC expression in human gastric carcinomas using a novel monoclonal antibody*. Int J Cancer, 1997. **74**(1): p. 112-21.
314. Baldus, S.E., et al., *Correlation of the immunohistochemical reactivity of mucin peptide cores MUC1 and MUC2 with the histopathological subtype and prognosis of gastric carcinomas*. Int J Cancer, 1998. **79**(2): p. 133-8.
315. Carrato, C., et al., *Differential apomucin expression in normal and neoplastic human gastrointestinal tissues*. Gastroenterology, 1994. **107**(1): p. 160-72.
316. Sakamoto, H., et al., *Mucin antigen expression in gastric carcinomas of young and old adults*. Hum Pathol, 1997. **28**(9): p. 1056-65.
317. Utsunomiya, T., et al., *Expression of MUC1 and MUC2 mucins in gastric carcinomas: its relationship with the prognosis of the patients*. Clin Cancer Res, 1998. **4**(11): p. 2605-14.
318. Reis, C.A., et al., *Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection*. J Clin Pathol, 2010. **63**(4): p. 322-9.
319. Hakomori, S., *Aberrant glycosylation in cancer cell membranes as focused on glycolipids: overview and perspectives*. Cancer Res, 1985. **45**(6): p. 2405-14.
320. Hakomori, S., *Tumor malignancy defined by aberrant glycosylation and sphingo(glyco)lipid metabolism*. Cancer Res, 1996. **56**(23): p. 5309-18.
321. Hollingsworth, M.A. and B.J. Swanson, *Mucins in cancer: protection and control of the cell surface*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(1): p. 45-60.
322. Clausen, H. and E.P. Bennett, *A family of UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyl-transferases control the initiation of mucin-type O-linked glycosylation*. Glycobiology, 1996. **6**(6): p. 635-46.
323. Hassan, H., et al., *The lectin domain of UDP-N-acetyl-D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-T4 directs its glycopeptide specificities*. J Biol Chem, 2000. **275**(49): p. 38197-205.



324. Ten Hagen, K.G., T.A. Fritz, and L.A. Tabak, *All in the family: the UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases*. *Glycobiology*, 2003. **13**(1): p. 1R-16R.
325. Homa, F.L., et al., *Isolation and expression of a cDNA clone encoding a bovine UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(17): p. 12609-16.
326. White, T., et al., *Purification and cDNA cloning of a human UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(41): p. 24156-65.
327. Bennett, E.P., H. Hassan, and H. Clausen, *cDNA cloning and expression of a novel human UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine. Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase, GalNAc-t3*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(29): p. 17006-12.
328. Hagen, F.K., et al., *cDNA cloning and expression of a novel UDP-N-acetyl-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(21): p. 13843-8.
329. Ten Hagen, K.G., et al., *Cloning and expression of a novel, tissue specifically expressed member of the UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase family*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(42): p. 27749-54.
330. Ten Hagen, K.G., et al., *Characterization of a UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase that displays glycopeptide N-acetylgalactosaminyltransferase activity*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(39): p. 27867-74.
331. Ten Hagen, K.G., et al., *Cloning and characterization of a ninth member of the UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase family, ppGalNTase-T9*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(20): p. 17395-404.
332. Bennett, E.P., et al., *Cloning of a human UDP-N-acetyl-alpha-D-Galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase that complements other GalNAc-transferases in complete O-glycosylation of the MUC1 tandem repeat*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(46): p. 30472-81.
333. Bennett, E.P., et al., *A novel human UDP-N-acetyl-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase, GalNAc-T7, with specificity for partial GalNAc-glycosylated acceptor substrates*. *FEBS Lett*, 1999. **460**(2): p. 226-30.
334. Bennett, E.P., et al., *Cloning and characterization of a close homologue of human UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-T3, designated GalNAc-T6. Evidence for genetic but not functional redundancy*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(36): p. 25362-70.
335. Guo, J.M., et al., *Molecular cloning and characterization of a novel member of the UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase family, pp-GalNAc-T12*. *FEBS Lett*, 2002. **524**(1-3): p. 211-8.
336. Zhang, Y., et al., *Cloning and characterization of a new human UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase, designated pp-GalNAc-T13, that is specifically expressed in neurons and synthesizes GalNAc alpha-serine/threonine antigen*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(1): p. 573-84.
337. Wang, H., et al., *Cloning and characterization of a novel UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase, pp-GalNAc-T14*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. **300**(3): p. 738-44.
338. Schwientek, T., et al., *Functional conservation of subfamilies of putative UDP-N-acetylgalactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases in Drosophila, Caenorhabditis elegans, and mammals. One subfamily composed of I(2)35Aa is essential in Drosophila*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(25): p. 22623-38.
339. Mandel, U., et al., *Expression of polypeptide GalNAc-transferases in stratified epithelia and squamous cell carcinomas: immunohistological evaluation using monoclonal*



- antibodies to three members of the GalNAc-transferase family.* Glycobiology, 1999. **9**(1): p. 43-52.
340. Gomes, J., et al., *Expression of UDP-N-acetyl-D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-6 in gastric mucosa, intestinal metaplasia, and gastric carcinoma.* J Histochem Cytochem, 2009. **57**(1): p. 79-86.
 341. Kohsaki, T., et al., *Expression of UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase isozymes T1 and T2 in human colorectal cancer.* J Gastroenterol, 2000. **35**(11): p. 840-8.
 342. Hanisch, F.G., et al., *Evidence for glycosylation-dependent activities of polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases rGalNAc-T2 and -T4 on mucin glycopeptides.* Glycobiology, 2001. **11**(9): p. 731-40.
 343. Shibao, K., et al., *Expression of UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine-polypeptide galNAc N-acetylgalactosaminyl transferase-3 in relation to differentiation and prognosis in patients with colorectal carcinoma.* Cancer, 2002. **94**(7): p. 1939-46.
 344. Freire, T., et al., *UDP-N-acetyl-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 6 (ppGalNAc-T6) mRNA as a potential new marker for detection of bone marrow-disseminated breast cancer cells.* Int J Cancer, 2006. **119**(6): p. 1383-8.
 345. Brockhausen, I., et al., *Enzymatic basis for sialyl-Tn expression in human colon cancer cells.* Glycoconj J, 1998. **15**(6): p. 595-603.
 346. Brockhausen, I., et al., *Pathways of mucin O-glycosylation in normal and malignant rat colonic epithelial cells reveal a mechanism for cancer-associated Sialyl-Tn antigen expression.* Biol Chem, 2001. **382**(2): p. 219-32.
 347. Marcos, N.T., et al., *Role of the human ST6GalNAc-I and ST6GalNAc-II in the synthesis of the cancer-associated sialyl-Tn antigen.* Cancer Res, 2004. **64**(19): p. 7050-7.
 348. Sewell, R., et al., *The ST6GalNAc-I sialyltransferase localizes throughout the Golgi and is responsible for the synthesis of the tumor-associated sialyl-Tn O-glycan in human breast cancer.* J Biol Chem, 2006. **281**(6): p. 3586-94.
 349. Dalziel, M., et al., *The relative activities of the C2GnT1 and ST3Gal-I glycosyltransferases determine O-glycan structure and expression of a tumor-associated epitope on MUC1.* J Biol Chem, 2001. **276**(14): p. 11007-15.
 350. Dennis, J.W., *Core 2 GlcNAc-transferase and polylactosamine expression in O-glycans.* Glycobiology, 1993. **3**(2): p. 91-3.
 351. Bierhuizen, M.F., K. Maemura, and M. Fukuda, *Expression of a differentiation antigen and poly-N-acetylglucosaminyl O-glycans directed by a cloned core 2 beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase.* J Biol Chem, 1994. **269**(6): p. 4473-9.
 352. Schwientek, T., et al., *Control of O-glycan branch formation. Molecular cloning of human cDNA encoding a novel beta1,6-N-acetylglucosaminyltransferase forming core 2 and core 4.* J Biol Chem, 1999. **274**(8): p. 4504-12.
 353. Nakayama, J., et al., *Expression cloning of a human alpha1, 4-N-acetylglucosaminyltransferase that forms GlcNAc α 1 $\rightarrow$ 4Gal β 1 $\rightarrow$ 6R, a glycan specifically expressed in the gastric gland mucous cell-type mucin.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(16): p. 8991-6.
 354. Hakomori, S., *Aberrant glycosylation in tumors and tumor-associated carbohydrate antigens.* Adv Cancer Res, 1989. **52**: p. 257-331.
 355. Feizi, T., *Demonstration by monoclonal antibodies that carbohydrate structures of glycoproteins and glycolipids are onco-developmental antigens.* Nature, 1985. **314**(6006): p. 53-7.
 356. Fukuda, M., *Possible roles of tumor-associated carbohydrate antigens.* Cancer Res, 1996. **56**(10): p. 2237-44.
 357. Kim, Y.J. and A. Varki, *Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer.* Glycoconj J, 1997. **14**(5): p. 569-76.



358. Fuster, M.M. and J.D. Esko, *The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(7): p. 526-42.
359. David, L., et al., *Simple mucin-type carbohydrate antigens (Tn, sialosyl-Tn and T) in gastric mucosa, carcinomas and metastases*. APMIS Suppl, 1992. **27**: p. 162-72.
360. Burchell, J., H. Durbin, and J. Taylor-Papadimitriou, *Complexity of expression of antigenic determinants, recognized by monoclonal antibodies HMFG-1 and HMFG-2, in normal and malignant human mammary epithelial cells*. J Immunol, 1983. **131**(1): p. 508-13.
361. Reis, C.A., et al., *Intestinal metaplasia of human stomach displays distinct patterns of mucin (MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6) expression*. Cancer Res, 1999. **59**(5): p. 1003-7.
362. Conze, T., et al., *MUC2 mucin is a major carrier of the cancer-associated sialyl-Tn antigen in intestinal metaplasia and gastric carcinomas*. Glycobiology, 2010. **20**(2): p. 199-206.
363. Hakomori, S., *Glycosylation defining cancer malignancy: new wine in an old bottle*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(16): p. 10231-3.
364. Springer, G.F., *T and Tn, general carcinoma autoantigens*. Science, 1984. **224**(4654): p. 1198-206.
365. Burchell, J.M., A. Mungul, and J. Taylor-Papadimitriou, *O-linked glycosylation in the mammary gland: changes that occur during malignancy*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2001. **6**(3): p. 355-64.
366. Cao, Y., et al., *Thomsen-Friedenreich-related carbohydrate antigens in normal adult human tissues: a systematic and comparative study*. Histochem Cell Biol, 1996. **106**(2): p. 197-207.
367. Kjeldsen, T., et al., *Preparation and characterization of monoclonal antibodies directed to the tumor-associated O-linked sialosyl-2----6 alpha-N-acetylgalactosaminyl (sialosyl-Tn) epitope*. Cancer Res, 1988. **48**(8): p. 2214-20.
368. Springer, G.F., P.R. Desai, and I. Banatwala, *Blood group MN antigens and precursors in normal and malignant human breast glandular tissue*. J Natl Cancer Inst, 1975. **54**(2): p. 335-9.
369. Ikeda, Y., et al., *Expression of Sialyl-Tn antigens in normal squamous epithelium, dysplasia, and squamous cell carcinoma in the esophagus*. Cancer Res, 1993. **53**(7): p. 1706-8.
370. Itzkowitz, S.H., et al., *Expression of Tn, sialosyl-Tn, and T antigens in human colon cancer*. Cancer Res, 1989. **49**(1): p. 197-204.
371. Schuessler, M.H., et al., *Blood group and blood-group-related antigens in normal pancreas and pancreas cancer: enhanced expression of precursor type 1, Tn and sialyl-Tn in pancreas cancer*. Int J Cancer, 1991. **47**(2): p. 180-7.
372. Itzkowitz, S., et al., *Expression of Tn, sialosyl Tn, and T antigens in human pancreas*. Gastroenterology, 1991. **100**(6): p. 1691-700.
373. Noguchi, M., et al., *Immunohistochemical distinction of malignant mesothelioma from pulmonary adenocarcinoma with anti-surfactant apoprotein, anti-Lewisa, and anti-Tn antibodies*. Hum Pathol, 1989. **20**(1): p. 53-7.
374. Inoue, M., et al., *Immunodetection of sialyl-Tn antigen in normal, hyperplastic and cancerous tissues of the uterine endometrium*. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol, 1991. **418**(2): p. 157-62.
375. Ravn, V., et al., *Simple mucin-type carbohydrates in normal and malignant human endometrium*. Int J Gynecol Pathol, 1995. **14**(2): p. 158-66.
376. Inoue, M., et al., *Expression of Tn and sialyl-Tn antigens in tumor tissues of the ovary*. Am J Clin Pathol, 1991. **96**(6): p. 711-6.



377. Nishiyama, T., et al., *Detection of Tn antigen with Vicia villosa agglutinin in urinary bladder cancer: its relevance to the patient's clinical course*. J Natl Cancer Inst, 1987. **78**(6): p. 1113-8.
378. Springer, G.F., *Tn epitope (N-acetyl-D-galactosamine alpha-O-serine/threonine) density in primary breast carcinoma: a functional predictor of aggressiveness*. Mol Immunol, 1989. **26**(1): p. 1-5.
379. Itzkowitz, S.H., et al., *Sialosyl-Tn. A novel mucin antigen associated with prognosis in colorectal cancer patients*. Cancer, 1990. **66**(9): p. 1960-6.
380. Ma, X.C., et al., *Expression of sialyl-Tn antigen is correlated with survival time of patients with gastric carcinomas*. Eur J Cancer, 1993. **29A**(13): p. 1820-3.
381. Werther, J.L., et al., *Mucin-associated sialosyl-Tn antigen expression in gastric cancer correlates with an adverse outcome*. Br J Cancer, 1994. **69**(3): p. 613-6.
382. Lindesmith, L., et al., *Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection*. Nat Med, 2003. **9**(5): p. 548-53.
383. Azevedo, M., et al., *Infection by Helicobacter pylori expressing the BabA adhesin is influenced by the secretor phenotype*. J Pathol, 2008. **215**(3): p. 308-16.
384. Fukuta, S., et al., *Monoclonal antibody CC3C195, which detects cancer-associated antigens in serum, binds to the human Lea blood group antigen and to its sialylated derivative*. Arch Biochem Biophys, 1987. **255**(1): p. 214-6.
385. Hirohashi, S., et al., *Distribution of blood group antigens and CA 19-9 in gastric cancers and non-neoplastic gastric mucosa*. Gann, 1984. **75**(6): p. 540-7.
386. Chia, D., et al., *Use of monoclonal antibodies to sialylated Lewisx and sialylated Lewisy for serological tests of cancer*. Cancer Res, 1985. **45**(1): p. 435-7.
387. Akamatsu, S., et al., *Alpha 2-->3sialyltransferase associated with the synthesis of CA 19-9 in colorectal tumors*. Cancer, 1996. **77**(8 Suppl): p. 1694-700.
388. Majuri, M.L., et al., *Expression and function of alpha 2,3-sialyl- and alpha 1,3/1,4-fucosyltransferases in colon adenocarcinoma cell lines: role in synthesis of E-selectin counter-receptors*. Int J Cancer, 1995. **63**(4): p. 551-9.
389. Matsushita, Y., et al., *Sialyl-dimeric Lewis-X antigen expressed on mucin-like glycoproteins in colorectal cancer metastases*. Lab Invest, 1990. **63**(6): p. 780-91.
390. Hanski, C., et al., *Altered glycosylation of the MUC-1 protein core contributes to the colon carcinoma-associated increase of mucin-bound sialyl-Lewis(x) expression*. Cancer Res, 1993. **53**(17): p. 4082-8.
391. Berg, E.L., et al., *A carbohydrate domain common to both sialyl Le(a) and sialyl Le(X) is recognized by the endothelial cell leukocyte adhesion molecule ELAM-1*. J Biol Chem, 1991. **266**(23): p. 14869-72.
392. Takada, A., et al., *Adhesion of human cancer cells to vascular endothelium mediated by a carbohydrate antigen, sialyl Lewis A*. Biochem Biophys Res Commun, 1991. **179**(2): p. 713-9.
393. Kim, Y.J., et al., *P-selectin deficiency attenuates tumor growth and metastasis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(16): p. 9325-30.
394. Borsig, L., et al., *Synergistic effects of L- and P-selectin in facilitating tumor metastasis can involve non-mucin ligands and implicate leukocytes as enhancers of metastasis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(4): p. 2193-8.
395. Fukuoka, K., N. Narita, and N. Saijo, *Increased expression of sialyl Lewis(x) antigen is associated with distant metastasis in lung cancer patients: immunohistochemical study on bronchofiberscopic biopsy specimens*. Lung Cancer, 1998. **20**(2): p. 109-16.
396. Tatsumi, M., et al., *Immunohistochemical expression of the sialyl Lewis x antigen on gastric cancer cells correlates with the presence of liver metastasis*. Clin Exp Metastasis, 1998. **16**(8): p. 743-50.
397. Nakamori, S., et al., *Involvement of carbohydrate antigen sialyl Lewis(x) in colorectal cancer metastasis*. Dis Colon Rectum, 1997. **40**(4): p. 420-31.



398. Baldus, S.E., et al., *Histopathological subtypes and prognosis of gastric cancer are correlated with the expression of mucin-associated sialylated antigens: Sialosyl-Lewis(a), Sialosyl-Lewis(x) and sialosyl-Tn*. Tumour Biol, 1998. **19**(6): p. 445-53.
399. Nakamori, S., et al., *Molecular mechanism involved in increased expression of sialyl Lewis antigens in ductal carcinoma of the pancreas*. J Exp Clin Cancer Res, 1999. **18**(3): p. 425-32.
400. Amado, M., et al., *Dimeric sialyl-Le(x) expression in gastric carcinoma correlates with venous invasion and poor outcome*. Gastroenterology, 1998. **114**(3): p. 462-70.
401. Grabowski, P., et al., *Expression of SIALYL-Le(x) antigen defined by MAb AM-3 is an independent prognostic marker in colorectal carcinoma patients*. Int J Cancer, 2000. **88**(2): p. 281-6.
402. Sarkar, A.K., et al., *Fucosylation of disaccharide precursors of sialyl LewisX inhibit selectin-mediated cell adhesion*. J Biol Chem, 1997. **272**(41): p. 25608-16.
403. Weston, B.W., et al., *Expression of human alpha(1,3)fucosyltransferase antisense sequences inhibits selectin-mediated adhesion and liver metastasis of colon carcinoma cells*. Cancer Res, 1999. **59**(9): p. 2127-35.
404. Hirai, M., et al., *Accumulation of liposome with Sialyl Lewis X to inflammation and tumor region: application to in vivo bio-imaging*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **353**(3): p. 553-8.
405. Nustad, K., et al., *Specificity and affinity of 26 monoclonal antibodies against the CA 125 antigen: first report from the ISOBM TD-1 workshop. International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. Tumour Biol, 1996. **17**(4): p. 196-219.
406. O'Brien, T.J., et al., *The CA 125 gene: an extracellular superstructure dominated by repeat sequences*. Tumour Biol, 2001. **22**(6): p. 348-66.
407. Yin, B.W., A. Dnistrian, and K.O. Lloyd, *Ovarian cancer antigen CA125 is encoded by the MUC16 mucin gene*. Int J Cancer, 2002. **98**(5): p. 737-40.
408. Chang, A., et al., *Usefulness of CA 125 as a preoperative prognostic marker for transitional cell carcinoma of the bladder*. J Urol, 2004. **172**(6 Pt 1): p. 2182-6.
409. Schneider, J., *Tumor markers in detection of lung cancer*. Adv Clin Chem, 2006. **42**: p. 1-41.
410. Baskic, D., et al., *Clinical evaluation of the simultaneous determination of CA 15-3, CA 125 and sHER2 in breast cancer*. Biomarkers, 2007. **12**(6): p. 657-67.
411. Sevinc, A., et al., *Benign causes of increased serum CA-125 concentration*. Lancet Oncol, 2007. **8**(12): p. 1054-5.
412. Harris, L., et al., *American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer*. J Clin Oncol, 2007. **25**(33): p. 5287-312.
413. Zurawski, V.R., Jr., et al., *Elevated serum CA 125 levels prior to diagnosis of ovarian neoplasia: relevance for early detection of ovarian cancer*. Int J Cancer, 1988. **42**(5): p. 677-80.
414. Pauler, D.K., et al., *Factors influencing serum CA125II levels in healthy postmenopausal women*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2001. **10**(5): p. 489-93.
415. Gostout, B.S. and M.A. Brewer, *Guidelines for referral of the patient with an adnexal mass*. Clin Obstet Gynecol, 2006. **49**(3): p. 448-58.
416. Ebeling, F.G., et al., *Serum CEA and CA 15-3 as prognostic factors in primary breast cancer*. Br J Cancer, 2002. **86**(8): p. 1217-22.
417. Kumpulainen, E.J., R.J. Kesikuru, and R.T. Johansson, *Serum tumor marker CA 15.3 and stage are the two most powerful predictors of survival in primary breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2002. **76**(2): p. 95-102.
418. Uehara, M., et al., *Long-term prognostic study of carcinoembryonic antigen (CEA) and carbohydrate antigen 15-3 (CA 15-3) in breast cancer*. Int J Clin Oncol, 2008. **13**(5): p. 447-51.



419. Duraker, N. and A.N. Celik, *The prognostic significance of preoperative serum CA 19-9 in patients with resectable gastric carcinoma: comparison with CEA*. J Surg Oncol, 2001. **76**(4): p. 266-71.
420. Lauro, S., et al., *Comparison of CEA, MCA, CA 15-3 and CA 27-29 in follow-up and monitoring therapeutic response in breast cancer patients*. Anticancer Res, 1999. **19**(4C): p. 3511-5.
421. Safi, F., et al., *Diagnostic value of CA 19-9 in patients with pancreatic cancer and nonspecific gastrointestinal symptoms*. J Gastrointest Surg, 1997. **1**(2): p. 106-12.
422. Locker, G.Y., et al., *ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer*. J Clin Oncol, 2006. **24**(33): p. 5313-27.
423. Reiter, W., et al., *Prognostic value of preoperative serum levels of CEA, CA 19-9 and CA 72-4 in gastric carcinoma*. Anticancer Res, 1997. **17**(4B): p. 2903-6.
424. Ychou, M., et al., *Clinical significance and prognostic value of CA72-4 compared with CEA and CA19-9 in patients with gastric cancer*. Dis Markers, 2000. **16**(3-4): p. 105-10.
425. Marrelli, D., et al., *Preoperative positivity of serum tumor markers is a strong predictor of hematogenous recurrence of gastric cancer*. J Surg Oncol, 2001. **78**(4): p. 253-8.
426. Carpelan-Holmstrom, M., et al., *Estimating the probability of cancer with several tumor markers in patients with colorectal disease*. Oncology, 2004. **66**(4): p. 296-302.
427. Louhimo, J., et al., *Preoperative hCGbeta and CA 72-4 are prognostic factors in gastric cancer*. Int J Cancer, 2004. **111**(6): p. 929-33.
428. Bakalakos, E.A., et al., *Is carcino-embryonic antigen useful in the follow-up management of patients with colorectal liver metastases?* Am J Surg, 1999. **177**(1): p. 2-6.
429. Goldstein, M.J. and E.P. Mitchell, *Carcinoembryonic antigen in the staging and follow-up of patients with colorectal cancer*. Cancer Invest, 2005. **23**(4): p. 338-51.
430. Louhimo, J., et al., *Serum HCG beta and CA 72-4 are stronger prognostic factors than CEA, CA 19-9 and CA 242 in pancreatic cancer*. Oncology, 2004. **66**(2): p. 126-31.
431. Siewert, J.R. and H.J. Stein, *Classification of adenocarcinoma of the oesophagogastric junction*. Br J Surg, 1998. **85**(11): p. 1457-9.
432. Siewert, J.R., et al., *Prognostic relevance of systematic lymph node dissection in gastric carcinoma*. German Gastric Carcinoma Study Group. Br J Surg, 1993. **80**(8): p. 1015-8.
433. Japanese Gastric Cancer, A., *Japanese Classification of Gastric Carcinoma - 2nd English Edition*. Gastric Cancer, 1998. **1**(1): p. 10-24.
434. Fenoglio-Preiser, C.M., et al., *Gastric Carcinoma*, in *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System.*, S. Hamilton and L.A. Aaltonen, Editors. 2000, IARC Press: Lyon.
435. Pinto-de-Sousa, J., et al., *Clinicopathological significance and survival influence of p53 protein expression in gastric carcinoma*. Histopathology, 2004. **44**(4): p. 323-31.
436. Hsu, S.M., L. Raine, and H. Fanger, *Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures*. J Histochem Cytochem, 1981. **29**(4): p. 577-80.
437. Taylor-Papadimitriou, J., et al., *Monoclonal antibodies to epithelium-specific components of the human milk fat globule membrane: production and reaction with cells in culture*. Int J Cancer, 1981. **28**(1): p. 17-21.
438. Burchell, J., et al., *A short sequence, within the amino acid tandem repeat of a cancer-associated mucin, contains immunodominant epitopes*. Int J Cancer, 1989. **44**(4): p. 691-6.
439. Kaplan, E.L. and P. Meier, *Nonparametric estimation from incomplete observations*. J Am Stat Assoc, 1958. **53**: p. 457-481.
440. Cox, D.R., *Regression models and life-tables*. J R Stat Soc B, 1972. **34**: p. 187-220.
441. Sousa, J., *Alguns aspectos epidemiológicos e clínicos do carcinoma do estômago*. Arq Port Cirurgia, 1997. **6**: p. 223-230.



442. Pinto de Sousa, J., *Carcinoma do estômago: Diferentes localizações - perfis clínico patológicos e prognósticos diferentes?*, in Faculdade de Medicina do Universidade do Porto. 2001: Porto, Portugal.
443. Preto, J., *Padrão clínico, patológico e molecular da recidiva do cancro gástrico.*, in Faculdade de Medicina da Universidade do Porto. 2006: Porto, Portugal.
444. Gore, R.M., *Gastric cancer. Clinical and pathologic features*. Radiol Clin North Am, 1997. **35**(2): p. 295-310.
445. Clark, C.J., et al., *Current problems in surgery: gastric cancer*. Curr Probl Surg, 2006. **43**(8-9): p. 566-670.
446. Kokkola, A. and P. Sipponen, *Gastric carcinoma in young adults*. Hepatogastroenterology, 2001. **48**(42): p. 1552-5.
447. Carvalho, R., et al., *Early-onset gastric carcinomas display molecular characteristics distinct from gastric carcinomas occurring at a later age*. J Pathol, 2004. **204**(1): p. 75-83.
448. Umeyama, K., et al., *Gastric carcinoma in young adults in Japan*. Anticancer Res, 1982. **2**(5): p. 283-6.
449. Ramos-De la Medina, A., et al., *Clinicopathologic characteristics of gastric cancer in a young patient population*. J Gastrointest Surg, 2004. **8**(3): p. 240-4.
450. Lim, S., et al., *Alteration of E-cadherin-mediated adhesion protein is common, but microsatellite instability is uncommon in young age gastric cancers*. Histopathology, 2003. **42**(2): p. 128-36.
451. Milne, A.N., et al., *Early onset gastric cancer: on the road to unraveling gastric carcinogenesis*. Curr Mol Med, 2007. **7**(1): p. 15-28.
452. Theuer, C.P., et al., *Gastric adenocarcinoma in patients 40 years of age or younger*. Am J Surg, 1996. **172**(5): p. 473-6; discussion 476-7.
453. Moreira, H., et al., *Early onset gastric cancer no longer presents as an advanced disease with ominous prognosis*. Dig Surg, 2009. **26**(3): p. 215-21.
454. Medina-Franco, H., M.J. Heslin, and R. Cortes-Gonzalez, *Clinicopathological characteristics of gastric carcinoma in young and elderly patients: a comparative study*. Ann Surg Oncol, 2000. **7**(7): p. 515-9.
455. Pinto-de-Sousa, J., *Carcinoma do estômago operado: Uma entidade diferente ou um carcinoma gástrico proximal?* Arq Port Cirurgia, 2001. **10**: p. 30-37.
456. Lardenoye, J.W., et al., *Survival of proximal third gastric carcinoma*. J Surg Oncol, 1998. **68**(3): p. 183-6.
457. Siewert, J.R., et al., *Problem of proximal third gastric carcinoma*. World J Surg, 1995. **19**(4): p. 523-31.
458. Antonioli, D.A. and H. Goldman, *Changes in the location and type of gastric adenocarcinoma*. Cancer, 1982. **50**(4): p. 775-81.
459. Kalish, R.J., et al., *Clinical, epidemiologic, and morphologic comparison between adenocarcinomas arising in Barrett's esophageal mucosa and in the gastric cardia*. Gastroenterology, 1984. **86**(3): p. 461-7.
460. Maehara, Y., et al., *Prognostic factors in adenocarcinoma in the upper one-third of the stomach*. Surg Gynecol Obstet, 1991. **173**(3): p. 223-6.
461. Sakaguchi, T., et al., *Characteristics and clinical outcome of proximal-third gastric cancer*. J Am Coll Surg, 1998. **187**(4): p. 352-7.
462. Wang, L.S., et al., *Lymph node metastasis in patients with adenocarcinoma of gastric cardia*. Cancer, 1993. **71**(6): p. 1948-53.
463. Belo-Soares, J., *Carcinoma gástrico. Experiência do Serviço de Cirurgia I do Hospital da Universidade de Coimbra, particularmente no carcinoma inicial (1974-1994)*. Arq Port Cirurgia, 1994. **3**: p. 199-220.
464. Mendes-de-Almeida, J., *Cirurgia paliativa por carcinoma do estômago. Estudo retrospectivo de 112 casos consecutivos*. Acta Médica Portuguesa, 1993. **6**(55-58).



465. Pereira, A., *Carcinoma gástrico inoperável e/ou irresssecável*. Arq Port Cirurgia, 1995. **4**(233-36).
466. Anderson, D.N., S. Campbell, and K.G. Park, *Accuracy of laparoscopic ultrasonography in the staging of upper gastrointestinal malignancy*. Br J Surg, 1996. **83**(10): p. 1424-8.
467. Maerz, L.L., et al., *Role of computed tomographic scans in the staging of esophageal and proximal gastric malignancies*. Am J Surg, 1993. **165**(5): p. 558-60.
468. Possik, R.A., et al., *Sensitivity, specificity, and predictive value of laparoscopy for the staging of gastric cancer and for the detection of liver metastases*. Cancer, 1986. **58**(1): p. 1-6.
469. Sendler, A., et al., *Preoperative staging of gastric cancer as precondition for multimodal treatment*. World J Surg, 1995. **19**(4): p. 501-8.
470. Stell, D.A., et al., *Prospective comparison of laparoscopy, ultrasonography and computed tomography in the staging of gastric cancer*. Br J Surg, 1996. **83**(9): p. 1260-2.
471. Pinto-de-Sousa, J., *232 carcinomas gástricos ressecados em 12 anos: a estabilização dos resultados ou a impotência da cirurgia*. Arq Port Cirurgia, 2000. **9**: p. 153-159.
472. Bozzetti, F., et al., *Subtotal versus total gastrectomy for gastric cancer: five-year survival rates in a multicenter randomized Italian trial*. Italian Gastrointestinal Tumor Study Group. Ann Surg, 1999. **230**(2): p. 170-8.
473. Pinto-de-Sousa, J., et al., *Complications in resection surgery of gastric and gastroesophageal junction carcinomas: analysis of a single-institution series*. Ann Oncol, 2010. **21**(Suppl 6): p. vi92 (Abstr P0227).
474. Hamilton, S.R. and L.A. Aaltonen, *World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of the Digestive Tract*. 2000, Lyon: IARC Press.
475. Tamura, G., et al., *Detection of frequent p53 gene mutations in primary gastric cancer by cell sorting and polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism analysis*. Cancer Res, 1991. **51**(11): p. 3056-8.
476. Lim, B.H., et al., *p53 accumulation and mutation are prognostic indicators of poor survival in human gastric carcinoma*. Int J Cancer, 1996. **69**(3): p. 200-4.
477. Tahara, E., *Molecular biology of gastric cancer*. World J Surg, 1995. **19**(4): p. 484-8; discussion 489-90.
478. Lacueva, F.J., et al., *Changes in P-glycoprotein expression in gastric carcinoma with respect to distant gastric mucosa may be influenced by p53*. Cancer, 2000. **89**(1): p. 21-8.
479. Roviello, F., et al., *P53 accumulation is a prognostic factor in intestinal-type gastric carcinoma but not in the diffuse type*. Ann Surg Oncol, 1999. **6**(8): p. 739-45.
480. Kim, J.H., et al., *Relationship between p53 overexpression and gastric cancer progression*. Oncology, 1997. **54**(2): p. 166-70.
481. Chen, B.F., et al., *Gastric carcinoma: recent issues in prognostic factors*. J La State Med Soc, 1995. **147**(4): p. 138-45.
482. Diez, M., et al., *P53 protein expression in gastric adenocarcinoma. Negative predictor of survival after postoperative adjuvant chemotherapy*. Anticancer Res, 2000. **20**(5C): p. 3929-33.
483. Gomyo, Y., et al., *Expression of p21 (waf1/cip1/sdi1), but not p53 protein, is a factor in the survival of patients with advanced gastric carcinoma*. Cancer, 1997. **79**(11): p. 2067-72.
484. Gomyo, Y., et al., *Numerical aberration and point mutation of p53 gene in human gastric intestinal metaplasia and well-differentiated adenocarcinoma: analysis by fluorescence in situ hybridization (FISH) and PCR-SSCP*. Int J Cancer, 1996. **66**(5): p. 594-9.



485. Hongyo, T., et al., *Mutations of the K-ras and p53 genes in gastric adenocarcinomas from a high-incidence region around Florence, Italy*. *Cancer Res*, 1995. **55**(12): p. 2665-72.
486. Kaye, P.V., et al., *Expression of p53 and p21waf1/cip1 in gastric carcinoma: lack of inter-relationship or correlation with prognosis*. *Eur J Surg Oncol*, 2000. **26**(1): p. 39-43.
487. Liu, X.P., et al., *Expression of p53 protein as a prognostic indicator of reduced survival time in diffuse-type gastric carcinoma*. *Pathol Int*, 2001. **51**(6): p. 440-4.
488. Muller, W. and F. Borchard, *Prognostic influence of p53 expression in gastric cancer*. *J Pathol*, 1996. **178**(3): p. 255-8.
489. Ogawa, M., et al., *A combination analysis of p53 and p21 in gastric carcinoma as a strong indicator for prognosis*. *Int J Mol Med*, 2001. **7**(5): p. 479-83.
490. Starzynska, T., et al., *The clinical significance of p53 accumulation in gastric carcinoma*. *Cancer*, 1996. **77**(10): p. 2005-12.
491. Wang, J.Y., et al., *Mutations of p53 gene in gastric carcinoma in Taiwan*. *Anticancer Res*, 2001. **21**(1B): p. 513-20.
492. Sanz-Ortega, J., et al., *Comparative study of tumor angiogenesis and immunohistochemistry for p53, c-ErbB2, c-myc and EGFr as prognostic factors in gastric cancer*. *Histol Histopathol*, 2000. **15**(2): p. 455-62.
493. Tang, H., et al., *Comparison of p53 expression in proximal and distal gastric cancer: histopathologic correlation and prognostic significance*. *Ann Surg Oncol*, 1997. **4**(6): p. 470-4.
494. Kasper, H.U., et al., *P53-protein accumulation and MDM2-protein overexpression in gastric carcinomas. No apparent correlation with survival*. *Pathol Res Pract*, 1999. **195**(12): p. 815-20.
495. Danesi, D.T., et al., *Flow cytometric DNA ploidy, p53, PCNA, and c-erbB-2 protein expressions as predictors of survival in surgically resected gastric cancer patients*. *Cytometry*, 2000. **42**(1): p. 27-34.
496. Martin, H.M., et al., *p53 expression and prognosis in gastric carcinoma*. *Int J Cancer*, 1992. **50**(6): p. 859-62.
497. Fondevila, C., et al., *p53 and VEGF expression are independent predictors of tumour recurrence and survival following curative resection of gastric cancer*. *Br J Cancer*, 2004. **90**(1): p. 206-15.
498. Hamada, M., et al., *The p53 gene is a potent determinant of chemosensitivity and radiosensitivity in gastric and colorectal cancers*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1996. **122**(6): p. 360-5.
499. Kimura, H., et al., *Apoptosis, cell proliferation and expression of oncogenes in gastric carcinomas induced by preoperative administration of 5-fluorouracil*. *Oncol Rep*, 2000. **7**(5): p. 971-6.
500. Nabeya, Y., et al., *The mutational status of p53 protein in gastric and esophageal adenocarcinoma cell lines predicts sensitivity to chemotherapeutic agents*. *Int J Cancer*, 1995. **64**(1): p. 37-46.
501. Yukimoto, K., et al., *Apoptosis and thymidylate synthase inductions by 5-fluorouracil in gastric cancer cells with or without p53 mutation*. *Int J Oncol*, 2001. **19**(2): p. 373-8.
502. Ozguroglu, M. and G. Demir, *Expression of p53 protein and resistance to preoperative chemotherapy in locally advanced gastric carcinoma*. *Cancer*, 1999. **86**(3): p. 547-9.
503. Yano, T., A. Ochiai, and T. Doi, *Expression of HER2 in gastric cancer: comparison between protein expression and gene amplification using a new commercial kit*. *J Clin Oncol*, 2004. **22**: p. 14S (Abstr 4053).
504. Lordick, F., Y.J. Bang, and Y.K. Kang, *HER2-positive advanced gastric cancer: similar HER2-positivity levels to breast cancer*. *Eur J Cancer*, 2007. **5**(4): p. 271 (Abstr 3541).



505. Kang, Y., Y. Bang, and F. Lordick, *Incidence of gastric and gastro-esophageal cancer in the ToGA trial: correlation with HER2 positivity*, in *Gastrointestinal Cancers Symposium*. 2008. p. 75 (Abstr 11).
506. Tokunaga, A., et al., *Clinical significance of epidermal growth factor (EGF), EGF receptor, and c-erbB-2 in human gastric cancer*. *Cancer*, 1995. **75**(6 Suppl): p. 1418-25.
507. Takehana, T., et al., *Status of c-erbB-2 in gastric adenocarcinoma: a comparative study of immunohistochemistry, fluorescence in situ hybridization and enzyme-linked immuno-sorbent assay*. *Int J Cancer*, 2002. **98**(6): p. 833-7.
508. Varis, A., et al., *Coamplified and overexpressed genes at ERBB2 locus in gastric cancer*. *Int J Cancer*, 2004. **109**(4): p. 548-53.
509. Kim, M.A., et al., *Evaluation of HER-2 gene status in gastric carcinoma using immunohistochemistry, fluorescence in situ hybridization, and real-time quantitative polymerase chain reaction*. *Hum Pathol*, 2007. **38**(9): p. 1386-93.
510. Carneiro, F., *Molecular pathology tools in gastrointestinal pathology*. *Int J Surg Pathol*, 2010. **18**(3 Suppl): p. 53S-55S.
511. Lemoine, N.R., et al., *Amplification and overexpression of the EGF receptor and c-erbB-2 proto-oncogenes in human stomach cancer*. *Br J Cancer*, 1991. **64**(1): p. 79-83.
512. Kameda, T., et al., *Expression of ERBB2 in human gastric carcinomas: relationship between p185ERBB2 expression and the gene amplification*. *Cancer Res*, 1990. **50**(24): p. 8002-9.
513. Van Cutsem, E., Y. Kang, and H. Chung, *Efficacy results from the ToGA trial: A phase III study of trastuzumab added to standard chemotherapy (CT) in first-line human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive advanced gastric cancer (GC)*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**: p. 18s (abstr LBA4509).
514. Cunningham, D., et al., *Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer*. *N Engl J Med*, 2006. **355**(1): p. 11-20.
515. Baba, H., et al., *Effect of lymph node dissection on the prognosis in patients with node-negative early gastric cancer*. *Surgery*, 1995. **117**(2): p. 165-9.
516. Barbosa, J., et al., *Factores de pronóstico do carcinoma gástrico*. *Arq Port Cirurgia*, 1996. **5**: p. 18-22.
517. Maehara, Y., et al., *Prophylactic lymph node dissection in patients with advanced gastric cancer promotes increased survival time*. *Cancer*, 1992. **70**(2): p. 392-5.
518. Moriguchi, S., et al., *A comparison of the logistic regression and the Cox proportional hazard models in retrospective studies on the prognosis of patients with gastric cancer*. *J Surg Oncol*, 1993. **52**(1): p. 9-13.
519. Siewert, J.R., et al., *Benefits of D2 lymph node dissection for patients with gastric cancer and pN0 and pN1 lymph node metastases*. *Br J Surg*, 1996. **83**(8): p. 1144-7.
520. Magalhães, A., *O significado clínico-patológico das micrometástases ganglionares no carcinoma gástrico*, in *Faculdade de Medicina da Universidade do Porto*. 2006: Porto, Portugal.
521. Cai, J., et al., *Micrometastasis in lymph nodes and microinvasion of the muscularis propria in primary lesions of submucosal gastric cancer*. *Surgery*, 2000. **127**(1): p. 32-9.
522. Choi, H.J., et al., *Occurrence and prognostic implications of micrometastases in lymph nodes from patients with submucosal gastric carcinoma*. *Ann Surg Oncol*, 2002. **9**(1): p. 13-9.
523. Ishigami, S., et al., *Clinical impact of micrometastasis of the lymph node in gastric cancer*. *Am Surg*, 2003. **69**(7): p. 573-7.
524. Kashimura, H., et al., *Risk factors for nodal micrometastasis of submucosal gastric carcinoma: assessment of indications for endoscopic treatment*. *Gastric Cancer*, 1999. **2**(1): p. 33-39.



525. Glockzin, G., H.J. Schlitt, and P. Piso, *Peritoneal carcinomatosis: patients selection, perioperative complications and quality of life related to cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy*. World J Surg Oncol, 2009. **7**: p. 5.
526. Yu, W., et al., *Indications for early postoperative intraperitoneal chemotherapy of advanced gastric cancer: results of a prospective randomized trial*. World J Surg, 2001. **25**(8): p. 985-90.
527. Kim, J.P., et al., *Results of surgery on 6589 gastric cancer patients and immunochemosurgery as the best treatment of advanced gastric cancer*. Ann Surg, 1992. **216**(3): p. 269-78; discussion 278-9.
528. Toge, T., *Effectiveness of immunochemotherapy for gastric cancer: a review of the current status*. Semin Surg Oncol, 1999. **17**(2): p. 139-43.
529. Kim, Y.H., et al., *Paclitaxel, 5-fluorouracil, and cisplatin combination chemotherapy for the treatment of advanced gastric carcinoma*. Cancer, 1999. **85**(2): p. 295-301.
530. Macdonald, J.S., et al., *Chemoradiotherapy after surgery compared with surgery alone for adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction*. N Engl J Med, 2001. **345**(10): p. 725-30.
531. Carneiro, F., et al., *Glycosylation features of gastric carcinoma initiation and progression. A review with emphasis on simple mucin-type carbohydrates and histo-blood group antigens of the Lewis system*. Eur J Cancer Prev, 1994. **3 Suppl 2**: p. 39-46.
532. Carneiro, F., et al., *T (Thomsen-Friedenreich) antigen and other simple mucin-type carbohydrate antigens in precursor lesions of gastric carcinoma*. Histopathology, 1994. **24**(2): p. 105-13.
533. Yamada, T., et al., *Sialosyl Tn antigen expression is associated with the prognosis of patients with advanced gastric cancer*. Cancer, 1995. **76**(9): p. 1529-36.
534. Yonezawa, S., et al., *Sialosyl-Tn antigen. Its distribution in normal human tissues and expression in adenocarcinomas*. Am J Clin Pathol, 1992. **98**(2): p. 167-74.
535. Victorzon, M., et al., *Sialyl Tn antigen is an independent predictor of outcome in patients with gastric cancer*. Int J Cancer, 1996. **65**(3): p. 295-300.
536. Ferreira, B., et al., *Terminal alpha1,4-linked N-acetylglucosamine in Helicobacter pylori-associated intestinal metaplasia of the human stomach and gastric carcinoma cell lines*. J Histochem Cytochem, 2006. **54**(5): p. 585-91.
537. Hirohashi, S., et al., *Blood group A cross-reacting epitope defined by monoclonal antibodies NCC-LU-35 and -81 expressed in cancer of blood group O or B individuals: its identification as Tn antigen*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(20): p. 7039-43.
538. Santos-Silva, F., et al., *Thomsen-Friedenreich antigen expression in gastric carcinomas is associated with MUC1 mucin VNTR polymorphism*. Glycobiology, 2005. **15**(5): p. 511-7.
539. Miles, D.W., et al., *Expression of sialyl-Tn in gastric cancer: correlation with known prognostic factors*. Br J Cancer, 1995. **71**(5): p. 1074-6.
540. Werther, J.L., et al., *Sialosyl-Tn antigen as a marker of gastric cancer progression: an international study*. Int J Cancer, 1996. **69**(3): p. 193-9.
541. Takahashi, I., et al., *Predictive value of preoperative serum sialyl Tn antigen levels in prognosis of patients with gastric cancer*. Cancer, 1993. **72**(6): p. 1836-40.
542. Guadagni, F., et al., *CA 72-4 measurement of tumor-associated glycoprotein 72 (TAG-72) as a serum marker in the management of gastric carcinoma*. Cancer Res, 1992. **52**(5): p. 1222-7.
543. Motoo, Y., et al., *Serum sialyl-Tn antigen levels in patients with digestive cancers*. Oncology, 1991. **48**(4): p. 321-6.
544. Farinati, F., et al., *TAG-72 serum determination in early and advanced gastric cancer*. Int J Cancer, 1989. **44**(2): p. 378-9.



545. Nakagoe, T., et al., *Pre-operative serum levels of sialyl Tn antigen predict liver metastasis and poor prognosis in patients with gastric cancer*. Eur J Surg Oncol, 2001. **27**(8): p. 731-9.
546. Chung, Y.S., et al., *Prognostic significance of T antigen expression in patients with gastric carcinoma*. Cancer, 1996. **77**(9): p. 1768-73.
547. Brockhausen, I., *Glycodynamics of mucin biosynthesis in gastrointestinal tumor cells*. Adv Exp Med Biol, 2003. **535**: p. 163-88.
548. Kudo, T., et al., *Molecular cloning and characterization of a novel UDP-Gal:GalNAc(alpha) peptide beta 1,3-galactosyltransferase (C1Gal-T2), an enzyme synthesizing a core 1 structure of O-glycan*. J Biol Chem, 2002. **277**(49): p. 47724-31.
549. Atkinson, B.F., et al., *Gastrointestinal cancer-associated antigen in immunoperoxidase assay*. Cancer Res, 1982. **42**(11): p. 4820-3.
550. Sakamoto, S., et al., *Expression of Lewis^a, Lewis^b, Lewis^x, Lewis^y, sialyl-Lewis^a, and sialyl-Lewis^x blood group antigens in human gastric carcinoma and in normal gastric tissue*. Cancer Res, 1989. **49**(3): p. 745-52.
551. Fukushima, K., et al., *Characterization of sialosylated Lewis^x as a new tumor-associated antigen*. Cancer Res, 1984. **44**(11): p. 5279-85.
552. Koprowski, H., et al., *Lewis blood-type may affect the incidence of gastrointestinal cancer*. Lancet, 1982. **1**(8285): p. 1332-3.
553. Bara, J., et al., *Distribution of GICA in normal gastrointestinal and endocervical mucosae and in mucinous ovarian cysts using antibody NS 19-9*. Am J Clin Pathol, 1986. **85**(2): p. 152-9.
554. Murata, K., et al., *Expression of blood group-related antigens, ABH, Lewis(a), Lewis(b), Lewis(x), Lewis(y), CA19-9, and CSLEX1 in early cancer, intestinal metaplasia, and uninvolved mucosa of the stomach*. Am J Clin Pathol, 1992. **98**(1): p. 67-75.
555. Nakasaki, H., et al., *Mosaicism in the expression of tumor-associated carbohydrate antigens in human colonic and gastric cancers*. Cancer Res, 1989. **49**(13): p. 3662-9.
556. Nakasaki, H., et al., *[Immunohistochemical studies on tumor associated carbohydrate antigens in gastric cancers of different histological stages]*. Nippon Geka Gakkai Zasshi, 1992. **93**(12): p. 1458-64.
557. Kushima, R., S. Jancic, and T. Hattori, *Association between expression of sialosyl-Tn antigen and intestinalization of gastric carcinomas*. Int J Cancer, 1993. **55**(6): p. 904-8.
558. Iwata, H., et al., *Expression of sialosyl-Tn in intestinal type cancer cells of human gastric cancers*. Acta Pathol Jpn, 1993. **43**(11): p. 646-53.
559. Carneiro, F., L. David, and M. Sobrinho-Simoes, *Sialyl-Tn expression in gastric carcinoma*. Eur J Cancer, 1994. **30A**(9): p. 1398-9.
560. Nakamori, S., et al., *Expression of carbohydrate antigen sialyl Le(a): a new functional prognostic factor in gastric cancer*. J Clin Oncol, 1997. **15**(2): p. 816-25.
561. Kakeji, Y., et al., *Correlation between sialyl Tn antigen and lymphatic metastasis in patients with Borrmann type IV gastric carcinoma*. Br J Cancer, 1995. **71**(1): p. 191-5.
562. Dohi, T., K. Abe, and S. Ohshiba, *Immunohistochemical study of carbohydrate antigen expression in gastric carcinoma*. Gastroenterol Jpn, 1989. **24**(3): p. 239-45.
563. Dohi, T., et al., *Immunohistological and biochemical detection of fucosylated polylectosamine antigen with monoclonal antibody ACFH18 in gastric cancer and normal gastric mucosa*. Jpn J Cancer Res, 1990. **81**(6-7): p. 676-81.
564. Ashizawa, T., et al., *The clinical significance of sialyl Lewis antigen expression in the spread of gastric cancer. Flow cytometric DNA analysis*. J Exp Clin Cancer Res, 2003. **22**(1): p. 91-8.
565. Nakamori, S., et al., *[Clinical value of carbohydrate antigens, sialyl Lewis-x and sialyl Lewis-a in gastrointestinal cancer]*. Nippon Geka Gakkai Zasshi, 1996. **97**(2): p. 165-71.
566. Torrado, J., et al., *Lewis antigen alterations in gastric cancer precursors*. Gastroenterology, 1992. **102**(2): p. 424-30.



- 567. Ogoshi, K., et al., *Glycosidically bound sialic acid levels as a predictive marker of postoperative adjuvant therapy in gastric cancer*. Cancer Immunol Immunother, 1992. **35**(3): p. 175-80.
- 568. Sorensen, A.L., et al., *Chemoenzymatically synthesized multimeric Tn/STn MUC1 glycopeptides elicit cancer-specific anti-MUC1 antibody responses and override tolerance*. Glycobiology, 2006. **16**(2): p. 96-107.
- 569. Zolg, W., *The proteomic search for diagnostic biomarkers: lost in translation?* Mol Cell Proteomics, 2006. **5**(10): p. 1720-6.
- 570. Azad, N.S., et al., *Proteomics in clinical trials and practice: present uses and future promise*. Mol Cell Proteomics, 2006. **5**(10): p. 1819-29.
- 571. Schwientek, T., et al., *A serial lectin approach to the mucin-type O-glycoproteome of Drosophila melanogaster S2 cells*. Proteomics, 2007. **7**(18): p. 3264-77.
- 572. Qian, W.J., et al., *Advances and challenges in liquid chromatography-mass spectrometry-based proteomics profiling for clinical applications*. Mol Cell Proteomics, 2006. **5**(10): p. 1727-44.
- 573. Motari, E., et al., *Analysis of Recombinant CD24 Glycans by MALDI-TOF-MS Reveals Prevalence of Sialyl-T Antigen*. Am J Biomed Sci, 2009. **1**(1): p. 1-11.

